

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE ÈS SCIENCES (PHYSIQUE)

PAR

PAUL ROBERT PAQUIN

Baccalauréat spécialisé en Biochimie

SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE ET DE FLUORESCENCE DES
RÉTINALS ET DES RÉTINOLS

Décembre 1980.

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.



Université du Québec à Trois-Rivières

Fiche-résumé de travail de recherche de 2e cycle

☒ Mémoire

☐ Rapport de recherche

☐ Rapport de stage

Nom du candidat: PAQUIN, Paul

Diplôme postulé: Maîtrise en Physique

Nom du directeur
de recherche: LEBLANC, Roger M.

Nom du co-directeur
de recherche (s'il y a lieu):

Titre du travail
de recherche: SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE ET DE FLUORESCENCE DES
RÉTINALS ET DES RÉTINOLS

Résumé:*

Nous avons déterminé à partir d'études en chromatographie sur couche mince ainsi que par spectroscopie en solution et en film solide que les molécules de polyènes conjuguées sont très sensibles à la température, à l'effet de la lumière et à l'autooxydation.

En déterminant les paramètres physico-chimiques des molécules comme le 11-cis rétinol et ses isomères, il a été possible d'en tirer des caractéristiques bien précises. Ainsi, la dégradation produite par effet de température, lumière et oxydation est beaucoup plus rapide chez les rétinoles que les rétinals. De plus, les mesures en spectroscopie de fluorescence des films de rétinoles ont permis de démontrer que tous les pigments (rétinals et rétinoles) ont un déplacement vers le rouge comparés à leurs spectres en solution. Ce déplacement est expliqué par une interaction chromophore-chromophore à l'interface air/solide. Quant à la présence de la bande à 290 nm, on l'attribue à un produit d'oxydation du film de polyène. Les mesures de polarisation de fluorescence des rétinals et des rétinoles montrent que l'excitation se produit dans la bande $^1\text{Bu} \longrightarrow ^1\text{Ag}$ de fortes probabilités, cependant il faut tenir compte qu'il y a la possibilité d'un couplage des états excités.

Nous avons dirigé une partie de notre travail vers l'étude en monocouche de ces pigments afin de comparer les résultats spectroscopiques à ceux des films solides.

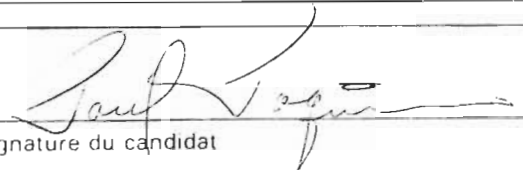
Nous avons aussi déterminé les paramètres qui nous permettent de prévoir le comportement des pigments à l'interface air/eau et de procéder à une étude plus poussée sur le rôle des pigments dans la membrane discale des bâtonnets. L'examen des mélanges de 11-cis rétinol et de différents phospholipides a apporté l'observation de résultats expérimentaux intéressants. En effet, le 11-cis rétinol est le chromophore de la rhodopsine, protéine responsable de l'absorption de l'énergie lumineuse. Cette protéine baigne dans une matrice lipidique. Lorsque l'on étudie les mélanges 11-cis rétinol/PE ou PS, à pH = 7.2, on observe une miscibilité des

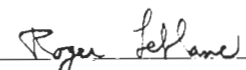
* Le résumé doit être dactylographié à double interligne.

constituants dans l'intervalle de pression de surface de 0 à 14 mN m^{-1} .

Quant aux mélanges 11-cis/PC, on note un comportement différent à celui des deux autres phospholipides quant aux propriétés monomoléculaires. On observe dans le cas de ces mélanges une répulsion des molécules, c'est-à-dire expansion du film. En considérant que la PE et PS sont distribuées majoritairement sur la face externe de la membrane discale tandis que la PC est concentrée sur la face interne, il est intéressant d'examiner l'emplacement du 11-cis rétinale en regard à la distribution des lipides. Ainsi, on aurait à $\text{pH} = 7.2$, une membrane dont la face externe serait chargée négativement, on retrouverait alors le 11-cis rétinale lié à l'opsine dans une matrice lipidique de PE et PS.

En considérant les mélanges 11-cis rétinale/phospholipides comme une introduction à un travail en profondeur, il serait important de reprendre cette étude avec des lipides synthétiques d'une plus grande pureté dont on connaîtrait la composition des chaînes d'acide gras. Une telle étude pourrait être suivie d'un projet relatif à l'effet de la lumière sur ces mélanges binaires afin de déterminer s'il y a spécificité d'un phospholipide sur l'interaction chromophore-lipide.


Signature du candidat
Date: Le 6 mai 1981


Signature du directeur de recherche
Date: Le 6 mai 1981

Signature du co-auteur (s'il y a lieu)
Date:

Signature du co-directeur (s'il y a lieu)
Date:

A ma femme Céline

et ma fille Julie.



Université du Québec à Trois-Rivières

Case postale 500, Trois-Rivières, Québec. / G9A 5H7
Téléphone: (819) 376-5011

Mardi le 26 mai 1981

Monsieur Pierre Tancrède
Professeur
Département de chimie-biologie
Université du Québec à Trois-Rivières

Monsieur,

A la suite d'une proposition faite par le Comité compétent, nous vous prions de bien vouloir examiner le mémoire de maîtrise en physique de monsieur Paul Paquin intitulé " Spectroscopie UV-visible et de fluorescence des rétinals et des rétinoles".

Espérant que vous serez en mesure de faire ce travail dans l'intérêt de l'université, nous joignons à cette lettre l'exemplaire numéro trois (3) du mémoire en question ainsi que les directives à suivre dans la préparation de votre rapport. Nous serions heureux de recevoir votre appréciation et vos commentaires avant le 3 juillet 1981.

Vous êtes également prié de nous retourner le mémoire en même temps que votre rapport.

Veuillez agréer, Monsieur, l'assurance de notre vive gratitude pour votre aimable collaboration ainsi que l'expression de nos sentiments distingués.

LE DOYEN DES ETUDES AVANCEES
ET DE LA RECHERCHE,

PAUL LAURIN

PL/jd

P.J. Directives et mémoire

c.c.: M. Pierre F. Blanchet, directeur
Département de chimie-biologie

REMERCIEMENTS

La recherche est un domaine bien particulier qui requiert un travail soutenu. L'étude des pigments visuels demande une adaptation spéciale, car la noirceur y est de rigueur. On sait que les molécules étudiées sont très sensibles aux rayons lumineux et que l'on doit travailler en obscurité, mais parfois ce sont nos idées qui se retrouvent en pleine noirceur.

C'est pourquoi je remercie sincèrement un homme dont le leadership est impeccable et qui a su éclairer mes idées lorsqu'il en était temps. Dans notre groupe on se plaît à l'appeler le "Patron", mon directeur de thèse le Dr Roger M. Leblanc que j'admire beaucoup. Merci Roger.

Je tiens aussi à remercier les autres membres du groupe de recherche en photobiologie et spécialement le Dr Surat Hotchandani. Un merci également aux techniciens du département de Chimie-Biologie.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	iii
TABLE DES MATIERES	iv
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	xii
1. INTRODUCTION	1
1.1 Généralités	1
1.2 Importance du 11-cis rétinol	13
1.3 But du travail	21
2. MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES	22
2.1 Chromatographie sur couche mince	22
2.1.1 Technique générale	22
2.1.2 Accessoires	23
2.1.3 Systèmes utilisés pour la chromatographie des rétinals et rétinols	28
2.2 Préparation de film solide	29
2.2.1 Technique de préparation	29
2.2.2 Lamelles	29
2.3 Préparation de film monomoléculaire	30
2.3.1 Montage du système de Langmuir	31
2.3.2 Purification de l'eau	36
2.3.3 Principe de la technique des monocouches	38

2.3.4	Etalonnage	41
2.3.5	Isotherme de pression de surface	42
2.3.5.1	Standardisation	42
2.3.5.2	Isotherme des polyènes	43
2.4	Déposition de monocouche et multicouche	44
2.4.1	Technique de déposition	44
2.4.2	Choix de la pression de surface	44
2.4.3	Support solide	45
2.5	Spectroscopie	48
2.5.1	Absorption	48
2.5.2	Fluorescence	48
3.	RESULTATS ET DISCUSSIONS	52
3.1	Chromatographie sur couche mince du 11-cis rétinol et de ses isomères	52
3.1.1	Chromatogrammes	52
3.1.2	Etude de la stabilité des pigments	61
3.1.3	Discussion	69
3.2	11-Cis rétinol en solution	70
3.2.1	Spectroscopie d'absorption	70
3.2.2	Discussion	77
3.3	11-Cis rétinol en film solide	78
3.3.1	Spectroscopie d'absorption	78
3.3.1.1	Spéctre en solution comparé à celui du film solide	78

3.3.1.2	Effet du temps sur le film solide à température ambiante	80
3.3.2	Discussion	83
3.4	11-Cis rétinol en monocouche	84
3.4.1	Détermination de l'isotherme de pression de surface	84
3.4.1.1	Etalonnage	84
3.4.1.2	Standardisation	86
3.4.1.3	L'isotherme de pression de surface	86
3.4.2	Déposition sur un support solide	94
3.4.3	Spectroscopie d'absorption en monocouche	96
3.4.4	Discussion	103
3.5	Isomères de rétinol et de rétinol en solution	105
3.5.1	Spectroscopie d'absorption	105
3.5.2	Spectroscopie de fluorescence	105
3.6	Isomères de rétinol et de rétinol en film solide	106
3.6.1	Spectre d'absorption	106
3.6.2	Spectroscopie de fluorescence en film solide	107
3.7	Isomères de rétinol et de rétinol en monocouche	137
3.7.1	Détermination de l'isotherme de pression de surface	137
3.7.2	Déposition sur support solide	137
3.7.3	Spectroscopie d'absorption	138
3.7.4	Spectroscopie de fluorescence	138

3.8	Etude des mélanges 11-cis rétinol/phospholipides	143
3.8.1	11-Cis rétinol/phosphatidyléthanolamine	144
3.8.2	11-Cis rétinol/phosphatidylsérine	150
3.8.3	11-Cis rétinol/phosphatidylcholine	155
3.8.4	Travail futur	161
4.	CONCLUSION	162
5.	BIBLIOGRAPHIE	165

LISTE DES FIGURES

1.	Composition cellulaire de la rétine d'un vertébré (Shichi, H., 1976)	3
2.	Ultrastructure d'un bâtonnet rétinien (Chabre, M., 1976) ...	5
3.	Structure moléculaire des disques de bâtonnet (Chabre, M., 1976)	6
4.	Le 11-cis rétinol est lié à la protéine opsine par un lien base de Schiff au groupement ϵ -aminé de la lysine	8
5.	Schéma des intermédiaires formés lors du blanchiment de la rhodopsine	10
6.	Mécanisme de phototransduction du bâtonnet rétinien (Hagins, W.A., 1972)	12
7.	Structure moléculaire des rétinals et du trans-rétinol	15
8.	Conformation 12-S-cis et 12-S-trans pour le 11-cis rétinol	16
9.	Diagramme des états excités pour le trans, 9-cis, 11-cis rétinol et le trans rétinol (Christensen, R.L. et B.E. Kohler, 1974)	19
10.	Schéma d'un bain de Langmuir	32
11.	Système de Langmuir, vue de profil	34
12.	Système de détection	35
13.	Diagramme montrant l'orientation de molécules d'acides gras en monocouche: avant(1) et après(2) compression	40

14. Orientation des molécules lors de la déposition à forte pression de surface (près du collapse, 1; faible pression de surface 2)	46
15. Types de déposition: X, Y et Z (Gaines, G.L. Jr., 1966)	47
16. Support à lamelles pour spectrophotomètre uv-visible	49
17. Plaque chromatographique des rétinals et des rétinoles (éluant: 3% acétone dans iso-octane)	54
18. Plaque chromatographique des rétinals (éluant: 15% éther diéthylique dans éther de pétrole)	56
19. Plaque chromatographique des rétinals (éluant: 20% éther diéthylique dans éther de pétrole)	58
20. Plaque chromatographique des rétinals et des rétinoles (éluant: 8% éther diéthylique dans éther de pétrole)	60
21. Spectre d'absorption du 11-cis rétinol dans le n-hexane	71
22. Spectre d'absorption du 11-cis rétinol dans l'éther diéthylique	73
23. Spectre d'absorption du 11-cis rétinol dans EPA	75
24. Spectres d'absorption du 11-cis rétinol en solution et en film solide	79
25. Spectres d'absorption de solution de 11-cis rétinol dans l'éther diéthylique obtenu à partir de films solides qui ont été laissés à la noirceur	82
26. Isotherme de pression de surface du tout- trans rétinol (sous-phase: tampon phosphate, pH = 8.0)	89

27.	Isotherme de pression de surface du 11-cis rétinol (sous-phase: tampon phosphate, pH = 8.0)	91
28.	Orientation moléculaire du 11-cis rétinol à l'interface air/eau	92
29.	Isotherme de pression de surface du 11-cis rétinol (sous-phase: tampon tris-HCl, pH = 7.2)	93
30.	Spectres d'absorption du 11-cis rétinol en monocouche (intervalles de temps: 0, 3, 24, 48 heures à 295 K)	99
31.	Spectres d'absorption du 11-cis rétinol en monocouche (intervalles de temps: 0, 20, 43, 63 heures à 283 K)	102
32.	Tout-trans rétinol en film solide: absorption, excitation et émission	110
33.	9-Cis rétinol en film solide: absorption, excitation et émission	112
34.	13-Cis rétinol en film solide: absorption, excitation et émission	114
35.	Tout-trans rétinol en film solide: absorption, excitation et émission	119
36.	Tout-trans rétinol acétate en film solide: absorption, excitation et émission	121
37.	Spectres d'absorption et d'excitation du trans rétinol (10^{-6} M) dans l'éther diéthylique	127
38.	Spectres d'excitation du trans rétinol en fonction de la concentration	129
39.	Spectres d'émission du trans rétinol en fonction de la concentration	131
40.	Tout-trans rétinol en film solide: absorption, excitation et émission	133
41.	Déplacement de la bande d'absorption du trans rétinol après 30 min à la noirceur	136
42.	Tout-trans rétinol en multicouche (arrangement de 40 monocouches): absorption, excitation et émission	141

43.	Isothermes de pression de surface du 11-cis rétinal (11-cis) et de la phosphatidyléthanolamine (PE)	145
44.	Isothermes de pression de surface: 0.2 11-cis/0.8 PE	147
45.	Isothermes de pression de surface: 0.5 11-cis/0.5 PE	148
46.	Isothermes de pression de surface: 0.8 11-cis/0.2 PE	149
47.	Isothermes de pression de surface du 11-cis rétinal (11-cis) et de la phosphatidylsérine (PS)	151
48.	Isothermes de pression de surface: 0.2 11-cis/0.8 PS	152
49.	Isothermes de pression de surface: 0.5 11-cis/0.5 PS	153
50.	Isothermes de pression de surface: 0.8 11-cis/0.2 PS	154
51.	Isothermes de pression de surface du 11-cis rétinal (11-cis) et de la phosphatidylcholine (PC)	156
52.	Isothermes de pression de surface: 0.2 11-cis/0.8 PC	157
53.	Isothermes de pression de surface: 0.5 11-cis/0.5 PC	158
54.	Isothermes de pression de surface: 0.8 11-cis/0.2 PC	159

LISTE DES TABLEAUX

1.	Liste des matériaux et produits utilisés en chromatographie sur couche mince	25
2.	Thermolabilité du tout-trans rétinol (295 K et 277 K)	62
3.	Effet du temps sur la stabilité du tout-trans rétinol à 295 K	66
4.	Identification des sous-produits du tout-trans rétinol	68
5.	Position des maxima dans le spectre d'absorption du 11-cis rétinol en film solide	80
6.	Propriétés spectroscopiques du 11-cis rétinol en monocouche à 295 K	96
7.	Propriétés spectroscopiques du 11-cis rétinol en monocouche à 283 K	100
8.	Propriétés de fluorescence des rétinals	115
9.	Propriétés de fluorescence des rétinols	122

1. INTRODUCTION

1.1 Généralités

La vision chez les êtres vivants joue un rôle primordial. Dès la naissance, le processus visuel domine chez le bébé, c'est à l'aide de leurs yeux qu'ils découvrent petit à petit le monde qui les entoure. L'enfant en grandissant développe d'autres moyens de communications, même à l'âge adulte 40 % des informations reçues proviennent de l'acte visuel, voilà pourquoi la vision est capitale.

La fonction de l'oeil se divise en deux systèmes bien distincts. Premièrement, le système optique qui a pour but de diriger le faisceau lumineux vers la rétine; deuxièmement, le système transducteur. La constitution du système optique est la suivante:

- la cornée
- l'iris
- le cristallin
- l'humeur aqueux
- le corps vitré

(Pirenne et Crouzy, 1972).

Quant au système transducteur situé au niveau de la rétine, on remarque un système très spécialisé qui transforme l'énergie

électromagnétique en énergie électrique. Cette énergie est acheminée au cerveau par les cellules nerveuses sous-jacentes au système transducteur (Ham, 1969).

Le système transducteur de la rétine est constitué physiologiquement de couches de cellules superposées les unes sur les autres. Elles se superposent de l'extérieur vers l'intérieur de l'oeil pour être reliées au nerf optique qui s'achemine vers le cerveau. La composition plus détaillée de la rétine des vertébrés est présentée à la figure 1. On note la membrane de Brunch (MB), l'épithélium pigmentaire (EP), la présence de granules de mélanines (Me), les segments externes des bâtonnets (SEB) et des cônes (SEC), les segments internes des bâtonnets (SIB) et des cônes (SIC) qui contiennent les noyaux (N), les mitochondries (Mi) ainsi qu'un cil (C), les cellules bipolaires (B), les cellules horizontales (H), les amacrines (A), les ganglionnaires (G) et les cellules de Mueller (M). (Shichi, 1976).

Dans la rétine, les processus primaires ont lieu au niveau des photorécepteurs. On classe morphologiquement les photorécepteurs selon deux catégories, en l'occurrence les cônes et les bâtonnets. Les cônes sont ainsi appelés dus à leur forme conique; ils contiennent trois types de pigments et ils sont responsables de la vision scotopique (couleurs). Quant à la classe des bâtonnets, ces cellules allongées ne contiennent qu'un pigment, la rhodopsine. Les bâtonnets sont beaucoup plus sensibles

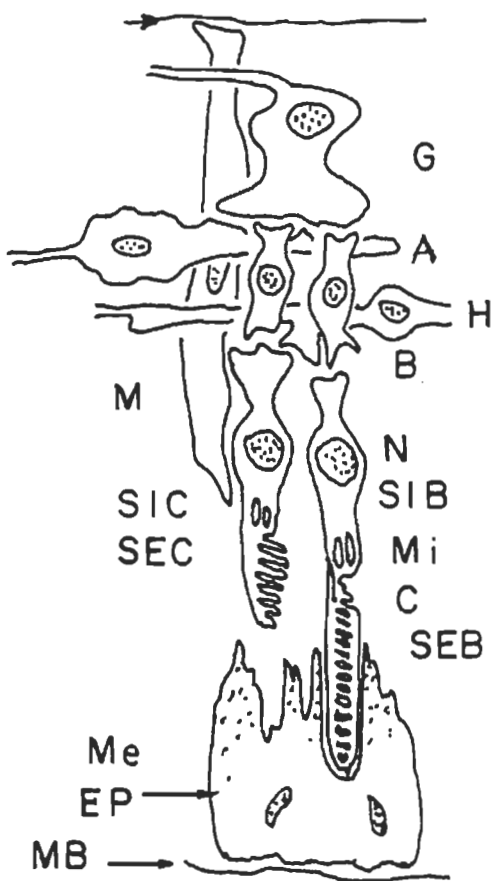


Figure 1. Composition cellulaire de la rétine d'un vertébré (Shichi, H., 1976).

à la lumière et ils sont responsables de la vision photopique (noir et blanc). En n'ayant qu'un seul pigment visuel et en se retrouvant en plus grande quantité, les bâtonnets ont été le sujet d'intensives études comparées à ceux des cônes.

La figure 2 montre l'ultrastructure du bâtonnet rétinien. Le bâtonnet est une cellule très spécialisée, il comprend deux segments reliés par un cil fin et fragile. Le segment interne (SIB) semblable aux autres cellules, contient les accessoires génétiques et énergétiques nécessaires au fonctionnement de la cellule. A la base de son segment interne, le bâtonnet possède des contacts synaptiques avec les couches nerveuses sous-jacentes. Le segment externe (SEB) est l'appareil photorécepteur, son travail se situe au niveau de l'absorption de l'énergie lumineuse. Le segment externe du bâtonnet est un sac de 30-50 μm de longueur et de 3 à 6 μm de diamètre, il contient un empilement de petits saccules appelés disques. Le nombre de disques est de l'ordre de 500 à 2 000 par bâtonnet (Chabre, 1976).

Les disques sont des saccules aplatis dont la membrane est constituée d'une bicouche lipidique d'une épaisseur de 5 nm séparée par un espace intradiscalaire de 2.5 nm comme on peut le remarquer à la figure 3. Quant à la composition de la bicouche, elle comprend des phospholipides (50% en poids sec), en l'occurrence

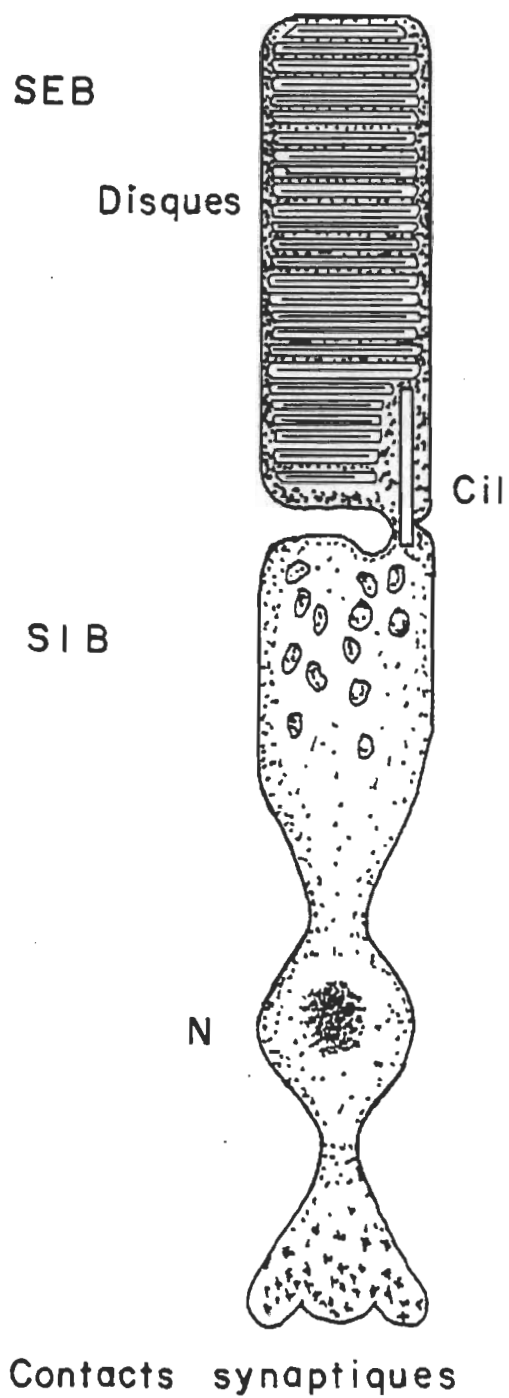


Figure 2. Ultrastructure d'un bâtonnet rétinien (Chabre, M., 1976)

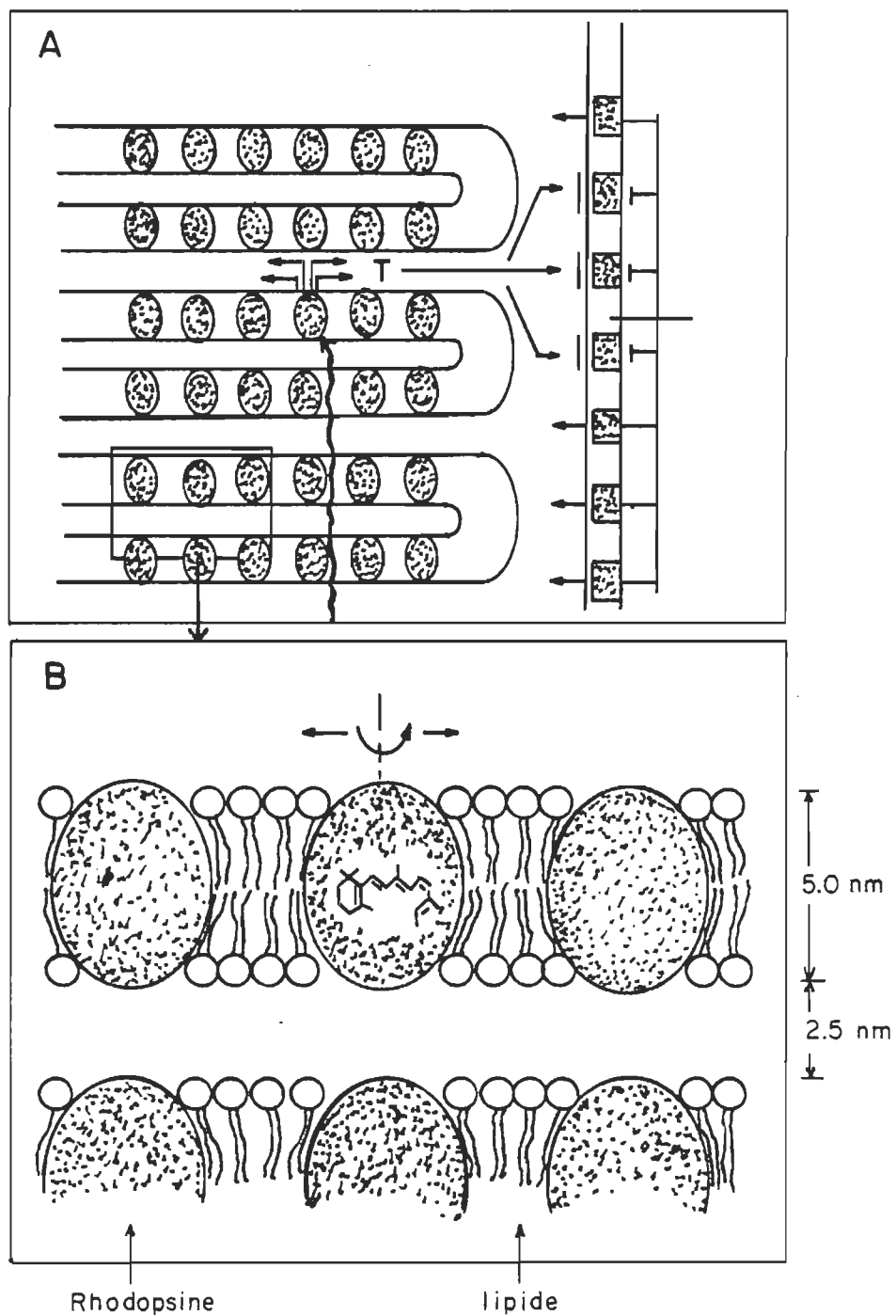


Figure 3. Structure moléculaire des disques de bâtonnet
(Chabre, M., 1976)

- phosphatidylcholine	20 %
- phosphatidyléthanolamine	20 %
- phosphatidylsérine	6.5 %
- phosphatidylinositol	1 %
- sphingomyéline	1 %
- cholestérol	1 %

et une partie protéique estimée à 40% en poids sec des disques.

Dans la partie protéique, la rhodopsine est la protéine la plus importante (35 %). Elle baigne dans la membrane dans un rapport de 1 molécule pour 60 à 90 molécules de phospholipides. C'est une glycoprotéine transmembranaire qui possède 50 % de résidus hydrophobes et 50 % de résidus hydrophiles (Chabre, 1976).

Différentes études ont situé le poids moléculaire de la rhodopsine entre 35 000 et 40 000 grammes (Cavanagh et Wald, 1969; Daemen et coll., 1972; Lewis et coll., 1974). Une mesure du poids moléculaire a été faite dans notre équipe de recherche à l'aide de la technique des monocouches, un poids de 37 000 g a été déterminé (Kossi et coll., 1977).

De nos jours, il est clairement établi que la rhodopsine est une protéine à deux unités. Une partie protéique soit l'opsine (un ensemble de 150 acides aminés dont on ne connaît pas la séquence précise) et le chromophore 11-cis rétinale qui est lié à la partie protéique par un lien de base de Schiff entre son groupement terminal aldéhyde et le groupement ϵ -amino de la lysine (voir figure 4) (De Grip et coll., 1973; Mathies et

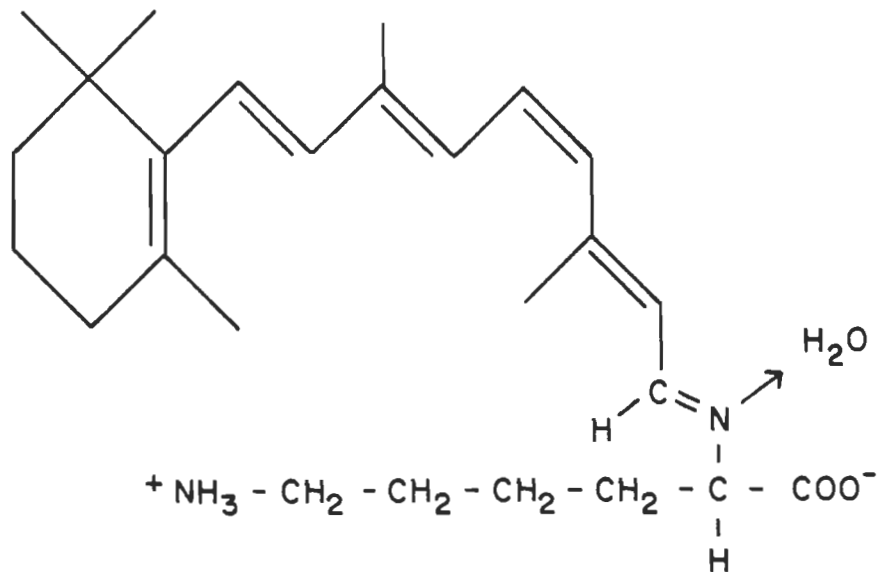
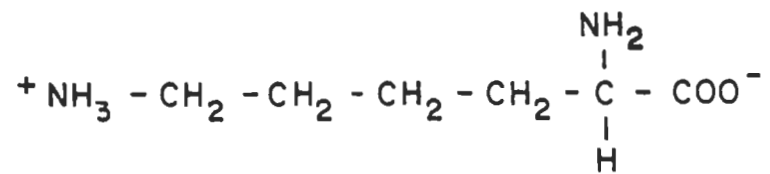
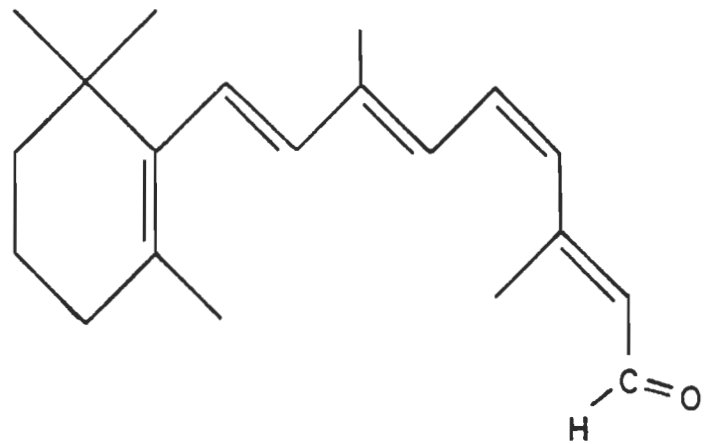


Figure 4. Le 11-cis rétinale est lié à la protéine opsine par un lien base de Schiff au groupement ε-aminé de la lysine

coll., 1976; Callender et coll., 1976).

L'acte primaire de la vision est celui de l'absorption d'un quantum de lumière par la rhodopsine, il s'ensuit un blanchiment de la molécule. Ce blanchiment est caractérisé par une série de processus thermiques dont la conséquence est de transformer le chromophore 11-cis rétinale en tout-trans rétinale, chromophore qui se libère de la partie protéique, soit l'opsine. La figure 5 présente un schéma des intermédiaires obtenus lors du blanchiment de la rhodopsine. Depuis la fin des années 50, il existe une série d'études qui ont permis d'obtenir ce schéma (Yoshizawa et Kito, 1958; Grellman et coll., 1962; Yoshizawa et Wald, 1963; Busch et coll., 1972; Bensasson et coll., 1975; Tokunga et coll., 1976; Goldschmidt et coll., 1976; Sundstroms et coll., 1977; Ippen et coll., 1978).

Parallèlement aux études des mécanismes primaires de la vision, les électrophysiologistes ont examiné le mécanisme électrique des bâtonnets en étudiant le système in vivo (Junk, 1973). Au début des années 70, W.A. Hagins s'appuyant sur les résultats obtenus in vivo et in vitro élaborait une hypothèse sur le mécanisme de phototransduction des bâtonnets, hypothèse que l'on accepte de plus en plus de nos jours.

En obscurité, il est connu que les bâtonnets sont hyperpolarisés, ils possèdent un courant sodique rapide circulant du segment interne vers le segment externe et ce courant est activé par une pompe située dans la membrane cytoplasmique du segment interne. Pendant ce temps, les disques

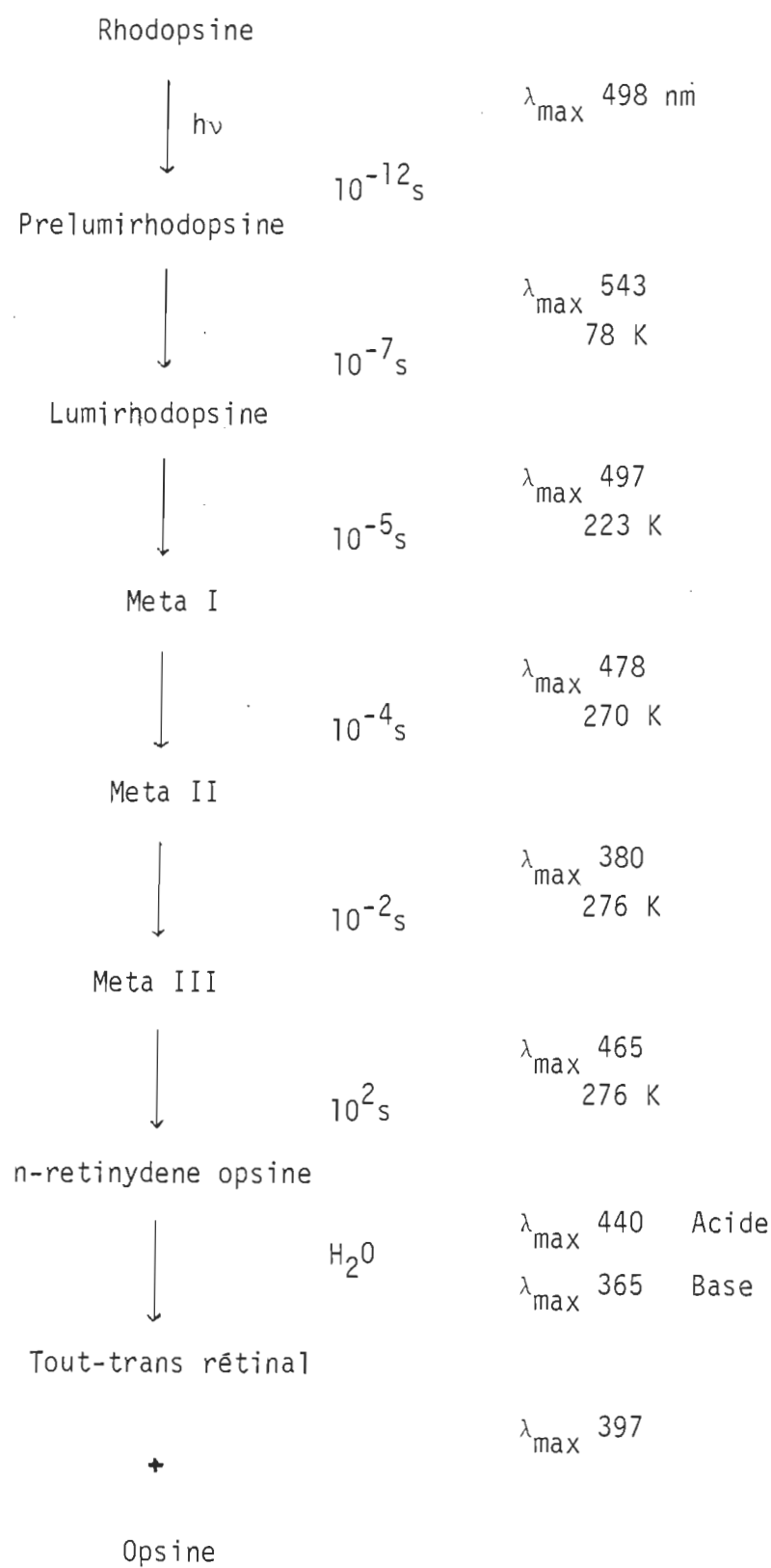


Figure 5. Schéma des intermédiaires formés lors du blanchiment de la rhodopsine

augmentent la concentration en ions calciques dans leurs espaces intradisciaux. En irradiant la rétine, les molécules de rhodopsine subissent une modification lors de l'isomérisation du 11-cis rétinale en tout-trans rétinale ce qui permettrait l'écoulement des ions calciums dans le milieu cytoplasmique des bâtonnets. A ce moment, les ions calciques se lieraient sur les sites d'entrée des ions sodiums au niveau de la membrane cytoplasmique du segment externe produisant ainsi une modification du potentiel chimique lors du blocage du courant sodique. Ce changement déclencherait un influx aux cellules nerveuses sous-jacentes qui serait ensuite acheminé au cerveau. La description de ce mécanisme est donnée dans le schéma de la figure 6 (Hagins, 1972; Hagins et Yoshikani, 1975; Shichi, 1976).

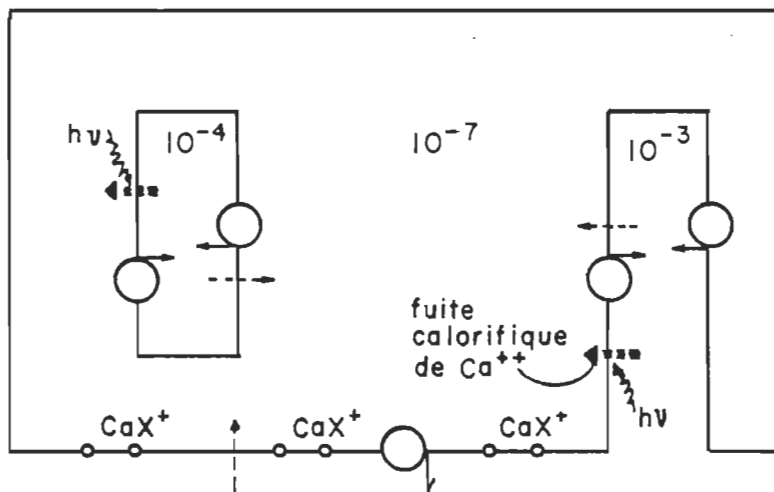
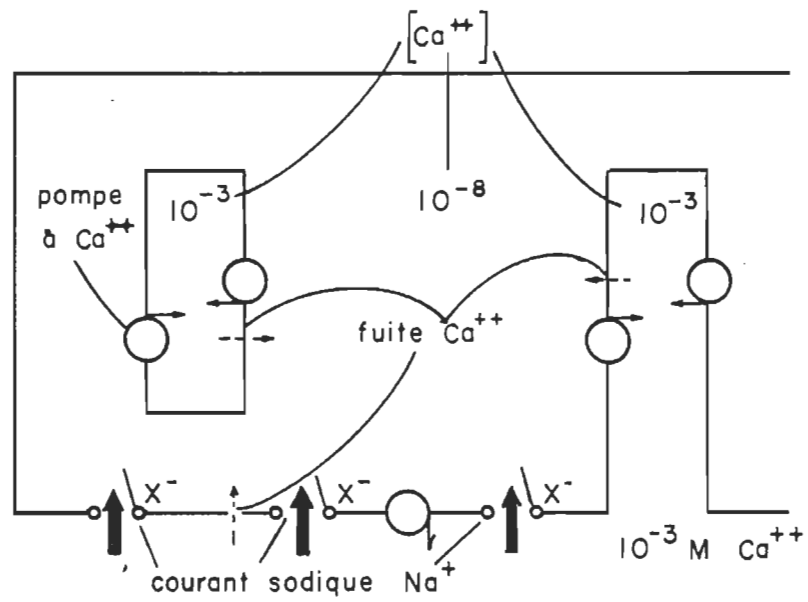


Figure 6. Mécanisme de phototransduction du bâtonnet rétinien (Hagins, W.A., 1972)

1.2 Importance du 11-cis rétinol

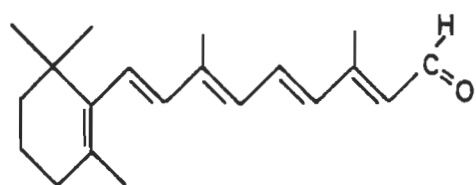
Historiquement, l'étude de molécules organiques de types linéaires conjugués a été entreprise au début des années 1930 par Hausser et coll. (1935). Ils ont démontré la relation entre la couleur de ces composés et la constitution chimique. Ils observèrent pour les polyènes linéaires la présence d'une forte transition dans la région visible ou dans le proche ultraviolet. Suite au manque d'intérêt pour l'étude de ce type de molécules, le sujet fut délaissé. On considérait ces composés comme des molécules organiques, dont on ne connaissait aucun rôle particulier. Linus Pauling, un des grands chimistes organiciens des années 50, s'était penché quelque peu sur l'étude des polyènes linéaires. Il émit une hypothèse selon laquelle il était impossible d'obtenir certains isomères de cette classe de molécules car lors de la rotation (180°) autour des doubles liaisons, l'empêchement stérique peut offrir une résistance telle qu'il en résulterait un bris de la molécule (Hubbard et Wald, 1968).

En travaillant sur l'extraction et la purification de la rhodopsine des bâtonnets, Wald (1933) isola un pigment qu'il appela rétinène puisqu'il provenait de la rétine. Des études d'extraction de ce produit suivirent (Diertele et Robertson, 1954; Brown et Wald, 1955) et l'on identifia ce pigment comme étant le chromophore de la rhodopsine, soit un polyène conjugué de la même famille que la vitamine A.

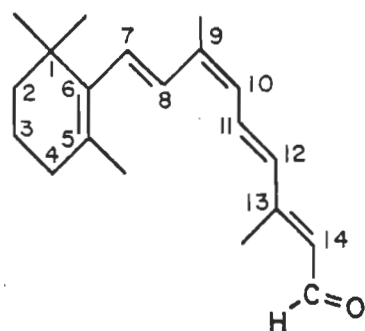
L'implication de ces molécules organiques au niveau de l'excitation visuelle a amené un intérêt croissant sur l'étude des caractéristiques physico-chimiques de ces composés. C'est pourquoi depuis les années 50, on note une quantité importante de travaux qui tente d'élucider la structure moléculaire ainsi que le rôle de ces molécules dans le mécanisme de phototransduction.

La figure 7 présente la structure moléculaire de polyènes linéaires, soit les rétinals (rétine aldéhyde) et ses isomères ainsi que le rétinol de forme trans (vitamine A). Quant à la structure générale, on note la présence d'un cycle β -ionone possédant deux groupements méthyles en position 1, un groupement méthyle en position 5 tandis qu'en position 6, une chaîne de neuf carbones (C_7-C_{15}) à doubles liaisons conjuguées qui est méthylée en position C_9 et C_{13} . Ce type de molécule possède plusieurs sites d'isomérisation ce qui favorise la possibilité de formation de nombreux isomères.

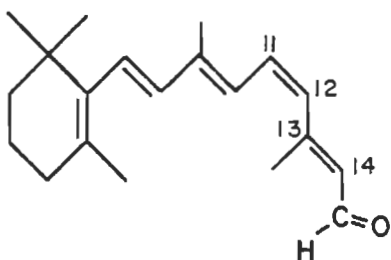
Les principaux isomères sont les suivants: tout-trans, la forme 11-cis qui est liée à l'opsine ainsi que les formes 13-cis et 9-cis. En plus de leur rotation principale, ces isomères ont d'autres rotations, soit en C_6-C_7 et $C_{12}-C_{13}$ ce qui a pour effet d'obtenir une molécule passablement tordue lorsqu'on l'examine dans un espace tridimensionnel. Comme exemple, la figure 8 montre que le 11-cis rétinol peut avoir la forme 6-S-cis 12-S-trans 11-cis rétinol ou 6-S-cis 12-S-cis 11-cis rétinol (Sperling, 1973; Ebrey et Honig, 1975; Birge et coll., 1975).



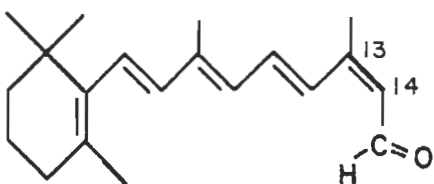
tout-trans rétinol



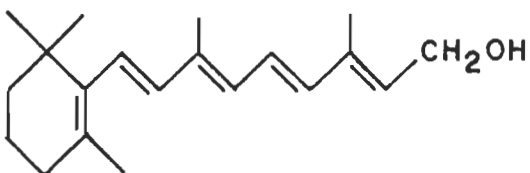
9-cis rétinol



11-cis rétinol



13-cis rétinol



trans rétinol

Figure 7. Structure moléculaire des rétinals et du trans rétinol

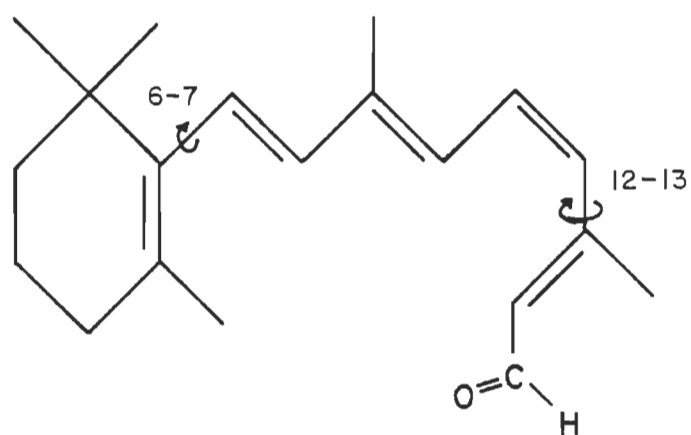
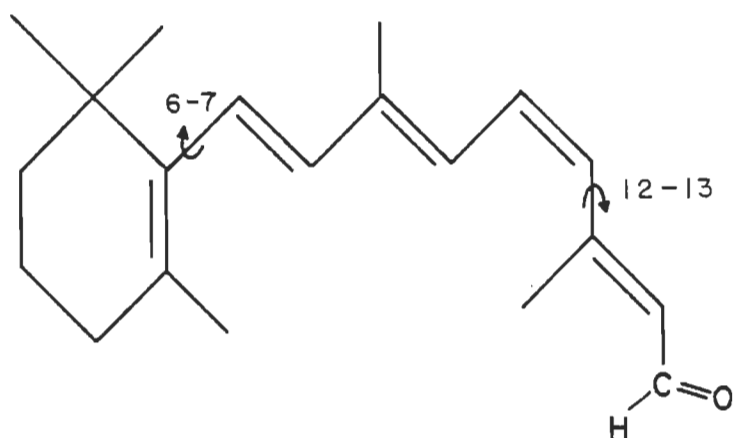


Figure 8. Conformation 12-S-cis et 12-S-trans pour le 11-cis rétinol

Les spectroscopies d'absorption et d'émission sont très employées pour déterminer les propriétés moléculaires de différents composés. L'étude par spectroscopie d'absorption ultraviolet-visible des polyènes s'est avérée peu révélatrice que ce soit à température ambiante ou à basse température (Staff of Biological Lab., 1959; Sperling, 1973). Quant à la spectroscopie d'émission, celle de fluorescence fut très employée ces dernières années pour l'étude de la structure électronique des polyènes.

L'étude par fluorescence bien qu'en apportant plus de précision sur la situation énergétique des états électroniques des molécules de type polyènes, a été à la base d'un long débat sur la position de l'état excité le plus bas. Dans les premiers travaux (Platt, 1953; Platt, 1956), Platt avait noté la présence d'une transition de forte probabilité provenant des états $1_{Bu} \leftarrow 1_{Ag}$. Bien que l'état 1_{Bu} était considéré comme l'état électronique singulet excité de plus basse énergie, des irrégularités ont été notées entre les résultats expérimentaux et les calculs théoriques (Birks et Dyson, 1963; Balke et Becker, 1967; Thompson, 1969; Dalle et Rosenberg, 1970). Au début des années 70, on note des développements intéressants dans ce domaine. Deux articles parurent successivement (Hudson et Kohler, 1972; Schulten et Karplus, 1972) sur l'étude en fluorescence du α,ω -diphényloctatétraène (D.P.O.). Hudson et Kohler (1972) rapportent la présence d'un état fantôme de plus basse énergie que l'état 1_{Bu} qu'ils attribuent à un état 1_{Ag} de faible transition électronique. Ce travail expérimental est supporté théoriquement dans le deuxième article, soit celui de Schulten

et Karplus (1972) sur la présence de l'état 1_{Ag} . Ils ont par la suite publié les calculs théoriques pour d'autres polyènes (Warshel et Karplus, 1974; Karplus et coll., 1975; Schulten et coll., 1976). Suite aux résultats de Hudson et Kohler (1972), d'autres travaux ont été publiés dont ceux de Moore et Song (1973) sur l'étude de polarisation de la fluorescence du tout-trans rétinol et du D.P.O. en solution dans de l'éther diéthylique à 77 K. Ils n'ont pas observé la présence de l'état fantôme. Ce à quoi Hudson et Kohler (1973) ont répondu que l'état 1_{Ag} est situé très près de l'état 1_{Bu} , ces états sont fortement couplés ce qui permettrait à l'état 1_{Ag} d'avoir les caractéristiques de polarisation de l'état 1_{Bu} (Birks et Birch, 1975).

Dans la littérature, on remarque aussi la présence d'études spécifiques sur les rétinals. La présence d'un groupement aldehyde à l'extrémité de la chaîne modifie le diagramme électronique de cette molécule, l'hétéroatome (oxygène) apporte un état $n\pi^*$ qui affecte les processus radiatifs et non-radiatifs. Il a été démontré que le mécanisme $n\pi^* \longrightarrow {}^3\Pi\Pi^*$ (intersystem-crossing) est celui qui peuple l'état triplet du rétinol (Dawson et Abrahamson, 1962; Abrahamson et Japar, 1972). Bien que plusieurs études aient été effectuées sur les rétinals, il reste beaucoup d'incertitudes quant à la situation énergétique réelle de ces états.

Christensen et Kohler (1974) ont établi le diagramme présenté à la figure 9 pour le tout-trans rétinol et les isomères 9-cis, 11-cis ainsi que du tout-trans rétinol. Ils ont admis que le 11-cis rétinol

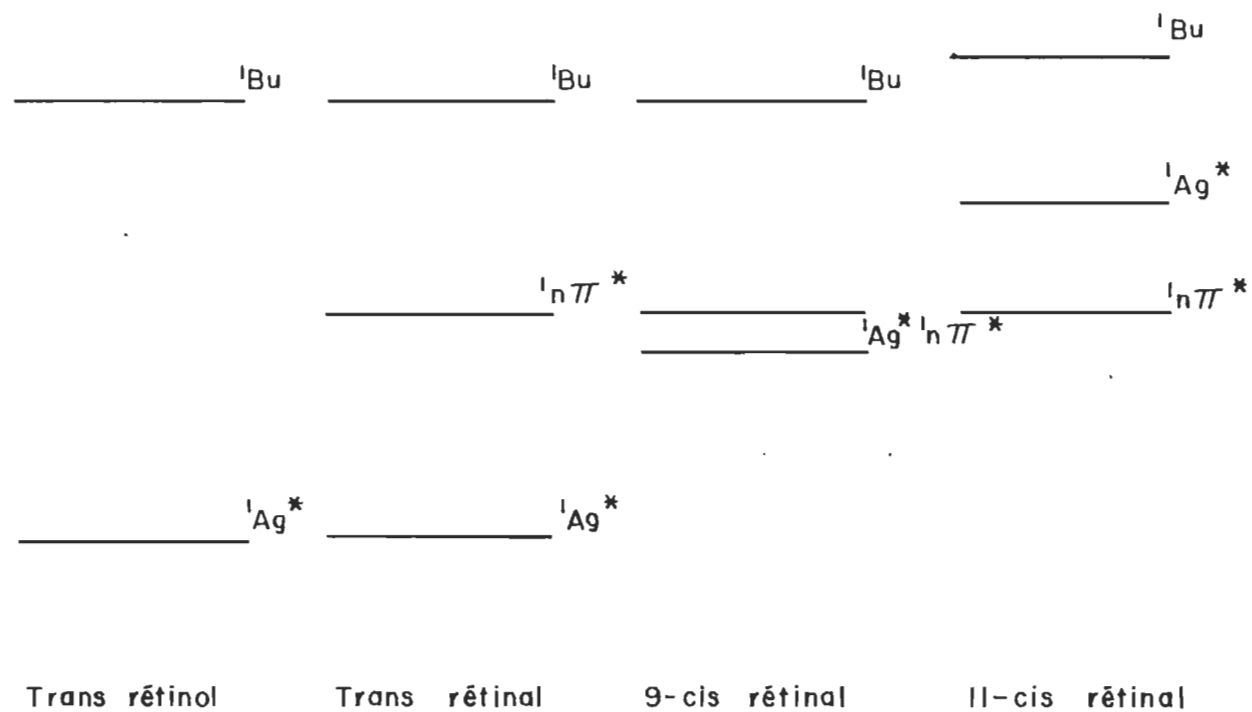


Figure 9. Diagramme des états excités pour le trans, 9-cis, 11-cis rétinol et le trans rétinol (Christensen, R.L. et B.E. Kohler, 1974)

possède un état $n\pi$ de niveau plus bas que l'état 1_{Ag} . Cependant, d'autres travaux diffèrent du précédent (Birge et coll., 1975; Birge et coll., 1976). Birge et ses collaborateurs ont observé la présence de l'état excité $\pi\pi^* 1_{Ag}$ dans le cas du 11-cis rétinol (6-S-cis 11-cis 12-S-trans) tandis que l'état $\pi\pi^* 1_{Bu}$ serait le plus bas pour le 11-cis rétinol (6-S-cis 11-cis 12-S-cis).

On se doit de mentionner l'importante contribution de Becker relative aux rétinaux liés par base de Schiff, protonnées et non-protonnées, dans l'espoir de trouver un modèle valable pour l'excitation visuelle (Becker et coll., 1971; Schaffer et coll., 1974; Hug et Becker, 1976; Becker et coll., 1976; Takemura et coll., 1976; Waddell et coll., 1977; Takemura et coll., 1978 a,b). Récemment, Birge et coll. (1978) confirmèrent la présence de l'état fantôme 1_{Ag} pour le tout-trans rétinol à l'aide de la spectroscopie biphotonique.

Depuis le travail de Hudson et Kohler en 1972, on observe une quantité importante d'articles dans ce domaine qui tentent d'expliquer la position des différents états électroniques des polyènes tels que rétinol et rétinol. Même s'il y a eu beaucoup de progrès, il reste toujours des interrogations. (Une revue exhaustive de cette étude est donnée dans les références suivantes: Dartnall, 1972; Hudson et Kohler, 1974; Honig et Ebrey, 1974; Honig et coll., 1975; Ebrey et Honig, 1975; Stone et Dratz, 1977).

1.3 But du travail

On remarque une littérature considérable sur l'étude du chromophore 11-cis rétinol depuis son isolation dans la rhodopsine. Plusieurs travaux ont été publiés dans le but d'élucider la structure moléculaire et électronique de ce type de molécules, soit les polyènes linéaires.

Notre travail de recherche a consisté à étudier les propriétés physico-chimiques des chromophores du pigment visuel en utilisant l'approche du modèle de membrane biologique artificielle. Nous avons étudié le tout-trans, 11-cis, 9-cis, 13-cis rétinals ainsi que le tout-trans rétinol à l'aide de systèmes modèles, soit la solution, le film solide et le film monomoléculaire. Les propriétés spectroscopiques de ces chromophores ont été obtenues ainsi que les propriétés monomoléculaires à l'interface air/eau.

2. MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES

2.1 Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince est une technique qui est de plus en plus employée par les chimistes, les biologistes et les biochimistes. Dans les années 50, Stahl (1969) a généralisé l'utilisation de la chromatographie sur couche mince. Elle est devenue depuis ce temps une des techniques de séparation et de purification la plus utilisée.

2.1.1 Technique générale

On définit par chromatographie un processus d'analyse par lequel la solution de substances à séparer passe sur un matériau solide, insoluble, minéral ou organique, réduit en poudre plus ou moins fine. Au cours de ce passage, les composants sont retenus différemment selon leurs caractéristiques particulières. On peut considérer comme mécanismes fondamentaux le partage entre deux phases liquides et la liaison réversible des composés en mouvement avec la surface de l'adsorbant. Quant aux forces de liaison impliquées, s'il s'agit de forces physiques superficielles, on se réfère à la chromatographie d'adsorption, par contre, en chromatographie par échange d'ions, il s'établit de vraies liaisons chimiques hétéropolaires entre composés mobiles et adsorbant. En pratique, on rencontre le plus souvent une combinaison des trois

mécanismes, soit adsorption, échange d'ions et de partage.

La chromatographie en couche mince utilise des supports solides (exemple, plaques de verre) enduits d'un adsorbant sur lequel on dépose la solution échantillon. La plaque est ensuite déposée dans une cuve à développement contenant le solvant approprié pour l'élution. Pour une chromatographie ascendante à une dimension, le solvant entraîne les substances contenues dans l'échantillon à des vitesses différentes; il se forme ainsi des zones, ce qui indique une séparation. Cette séparation peut être provoquée par des phénomènes d'adsorption, de partage, d'échange d'ions, ou encore par une combinaison de ces différents phénomènes. Normalement, on laisse migrer le front de solvant sur une distance d'environ 15 cm, on enlève la plaque de la cuve et on laisse sécher. On calcule les valeurs de R_f des différentes substances séparées ce qui permet de vérifier la reproductibilité des chromatogrammes. On définit ainsi le R_f ,

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par l'échantillon}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$$

2.1.2 Accessoires

Les plaques pour la chromatographie en couche mince ont été préparées commercialement (voir tableau 1). Nous avons utilisé deux

sortes de plaque: (i) des plaques de verre enduites de gel de silice G-254 d'une épaisseur de 250 μm . Ces plaques ont des dimensions de 20 cm x 20 cm qui se sectionnent en quatre plaques de 5 cm x 20 cm; (ii) l'autre sorte de plaque ressemble à une épaisse feuille de papier. C'est un procédé nouveau, elle est composée d'un mélange de fibres de verre et d'adsorbant. L'avantage de ces plaques est de pouvoir les découper de la grandeur désirée. Lorsqu'on récupère un produit, on découpe la tache et on la laisse tremper dans le solvant.

Quant à l'élution, nous avons employé, lors des premières expériences, les cuves conventionnelles qui servent pour les plaques 20 cm x 20 cm. Mais les cuves cylindriques de plus petite dimension se sont avérées plus efficaces pour notre travail.

Le choix des solvants utilisés pour l'élution provient de la référence de John et coll. (1965). Cette référence est le point de départ pour les conditions de nos solvants; on a ensuite effectué quelques modifications dans le but d'améliorer la séparation de nos chromophores.

Toutes les solutions ont été préparées dans l'éther diéthylique "Aristar" de très haute pureté. On dépose les échantillons sur les plaques à l'aide de micropipettes disposables ou d'une seringue de 10 microlitres.

Tableau 1. Liste des matériaux et produits utilisés en chromatographie sur couche mince

MATERIEL ET PRODUIT	PROVENANCE	CARACTERISTIQUES
Plaques à chromatographie en verre 20 cm x 20 cm	Mandel Scientific Co. Montréal, Québec	Gel de silice GF-254 épaisseur de 250 μ m (pre-scored).
Plaques à chromatographie en feuille 20 cm x 20 cm	Gelman Fisher Scientific Cie. Ltd. Montréal, Québec	ITL/SA fibres de verre imprégnés de gel de silice.
Dessicateur	Fisher Scientific Cie. Ltd.	
Support à plaques	Fisher Scientific Cie. Ltd.	Pour déposer les plaques dans l'étuve.
L'étuve	Fisher Scientific Cie. Ltd.	Température 393 K.
Cuves à chromatographie -rectangulaires	Fisher Scientific Cie. Ltd.	Conventionnelles pour les plaques de 20 cm x 20 cm.
-cylindriques	Mandel Scientific Co. Montréal, Québec	Cylindre à chroma- tographie pour les plaques de 5 cm x 20 cm.
	Applied Science Lab. State College Pennsylvania, USA	Mini support à cylin- dre à chromatographie contenant 5 cylindres pour chromatographie 5 cm x 20 cm.

MATERIEL ET PRODUIT	PROVENANCE	CARACTERISTIQUES
Micropipettes	Mandel Scientific Co. Montréal, Québec	Micropipettes de 4 μ l disposables.
Microseringue	Fisher Scientific Cie Ltd. Montréal, Québec	Seringue 10 μ l Hamilton.
Règle Desaga	Mandel Scientific Co. Montréal, Québec	Pour quantifier les chromatogrammes.
Règle R_f	Mandel Scientific Co. Montréal, Québec	Pour mesurer les valeurs R_f .
Applicateur avec azote (Spot Dryer)	Mandel Scientific Co. Montréal, Québec	Pour déposer les échantillons sous un courant d'azote.
Atomiseur (Sprayon Jet Pak Kit)	Mandel Scientific Co. Montréal, Québec	Pour vaporiser la substance révélatrice sur les plaques.
Ether diéthylique		
- ANALAR	BDH Chemicals Ville St-Laurent, Québec	Qualité analytique stabilisée en présence de 2 % d'éthanol.
- ARISTAR	BDH Chemicals Ville St-Laurent, Québec	99.7 % de pureté.
Iso-octane	Fisher Scientific Cie. Ltd. Montréal, Québec	Qualité spectrale

MATERIEL ET PRODUIT	PROVENANCE	CARACTERISTIQUES
Chloroforme	Fisher Scientific Cie. Ltd.	Qualité spectrale
Acétone	Fisher Scientific Cie. Ltd.	Qualité spectrale
Ether de pétrole (308-338 K)	Fisher Scientific Cie. Ltd.	
Ethanol	Gatineau, Québec	95 % de pureté
Tout-trans rétinol	Sigma Chemical Co.	
9-cis rétinol	Sigma Chemical Co.	
13-cis rétinol	Sigma Chemical Co.	
Tout-trans rétinol	Sigma Chemical Co.	
13-cis rétinol	Sigma Chemical Co.	
Rétinol acétate	Sigma Chemical Co.	
11-cis rétinol	Hoffman La Roche	

2.1.3 Systèmes utilisés pour la chromatographie des rétinals et rétinols

Les plaques G-254 ont été activées au four à 393 K pendant deux heures, les feuilles de type Gelman n'ont pas besoin d'être activées puisqu'elles sont enveloppées séparément dans des sachets scellés.

Le système de solvant employé pour l'élution est l'iso-octane en présence de 3% d'acétone (John et coll., 1965). Il est déposé dans la cuve cylindrique environ une heure avant la chromatographie afin de saturer la chambre. L'étalement des échantillons sur les plaques se fait avec une seringue 10 μ l en présence d'un jet d'azote. On dépose les échantillons à 1 cm du bord de la plaque, on laisse une distance de 1.5-2.0 cm entre chaque tache, et finalement, il faut les placer à 2 cm du bas pour que le solvant ne touche pas à l'échantillon. Ensuite, on dépose la plaque dans la cuve et on laisse migrer le front de solvant jusqu'à 15 cm.

Lorsque la chromatographie est terminée, on révèle les échantillons en vaporisant une solution de chlorure d'antimoine 25% p/v dans le chloroforme. Cette solution, qu'on appelle réactif de Carr Price, colore les rétinols en bleu et les rétinals en brun ce qui nous permet de les identifier. Afin d'obtenir le spectre d'absorption en solution des chromophores purifiés sur les plaques, on doit gratter la tache sur la plaque, le produit est déposé dans un Buchner et ensuite filtré en utilisant un solvant approprié.

Il est à noter que les pigments sont très sensibles à la lumière et à la température. Ainsi, toutes les manipulations ont été effectuées à une température de 294 ± 1 K et en présence d'une lumière rouge de faible intensité à une longueur d'onde à laquelle les pigments n'absorbent pas.

2.2 Préparation de film solide

Les films solides ont été utilisés pour des mesures spectroscopiques. C'est un système qui se situe bien entre une étude en solution et celle en monocouche. De plus, on peut avantageusement comparer les résultats en film solide à ceux de référence obtenus à 77 K.

2.2.1 Technique de préparation

On emploie des lamelles de 5.0 cm x 2.6 cm sur lesquelles on dépose quelques gouttes de solution, on évapore le solvant éther diéthylique à l'aide d'un jet d'azote. On peut ensuite enregistrer les spectres de ces films.

2.2.2 Lamelles

L'étape la plus critique dans la préparation des films solides est le nettoyage des lamelles. Des lamelles de verre pour microscope (Fisher) ou des lamelles de quartz plus résistantes au nettoyage sont employées.

Le nettoyage des lamelles se fait en les trempant dans une solution d'acide sulfochromique pendant une période de temps variant de 7 à 20 heures. Par la suite, on met les lamelles dans une solution 0.1 M NaOH et on les laisse tremper. Avant utilisation, on les rince avec de l'eau tridistillée et on les assèche avec un jet d'azote. Une fois les lamelles bien nettoyées, on vérifie si la surface est propre et hydrophile. Il suffit de placer une goutte d'eau sur la surface de la lamelle et de voir si elle s'étend uniformément. Pour de plus amples détails sur le nettoyage des lamelles, voir Munger (1978).

2.3 Préparation de film monomoléculaire

La préparation d'un film monomoléculaire à l'interface air/eau demande l'utilisation d'un système adéquat. Langmuir en 1917 a été l'un des instigateurs de la technique des monocouches, par la suite plusieurs auteurs tels que Guastalla (1938), Anderson et Evett (1952), Mann et Hansen (1960), Gaines Jr. (1963), Suzuki et coll. (1967), Munger et Leblanc (1980), ont apporté différentes modifications au système permettant à la fois de faciliter les méthodes de mesures et d'augmenter la précision.

2.3.1 Montage du système de Langmuir

Nous avons utilisé le système conventionnel qui permet d'enregistrer des mesures de pression variant de 1 à 40 mN m⁻¹.

La figure 10 montre un schéma de l'appareillage qui a été fabriqué dans nos ateliers et conçu en fonction de notre travail de recherche. Le bain principal (bain de monocouche) est fait en panneaux de verre qui sont assemblés avec de la colle silicone non-toxique. Il possède une longueur de 33.0 cm, une largeur de 14.8 cm et une hauteur de 5.0 cm. Afin d'obtenir une surface de bain complètement hydrophobe et sans contamination, il est recouvert de téflon. Lorsque le téflon semble contaminé, on peut le changer (la contamination est visible lorsqu'en succionnant l'eau dans le fond du bain, il y a formation de petites mares d'eau). Le bain étant entièrement recouvert de téflon, cette surface hydrophobe permet d'éviter l'écoulement de l'eau et donc la fuite de la monocouche par dessus les rebords du bain.

Une barrière de verre recouverte, elle aussi, de téflon est déposée sur le bain, ses dimensions sont les suivantes: 22 cm de long, 1.5 cm de large, 0.6 cm de haut. La barrière mobile est appuyée sur les rebords du bain et de chaque côté, elle vient se terminer dans les étriers ce qui permet sa mobilité. Aux endroits où la barrière mobile est en contact avec le rebord du bain, on applique une pression en plaçant un poids d'environ 100 g. La mobilité de cette barrière est

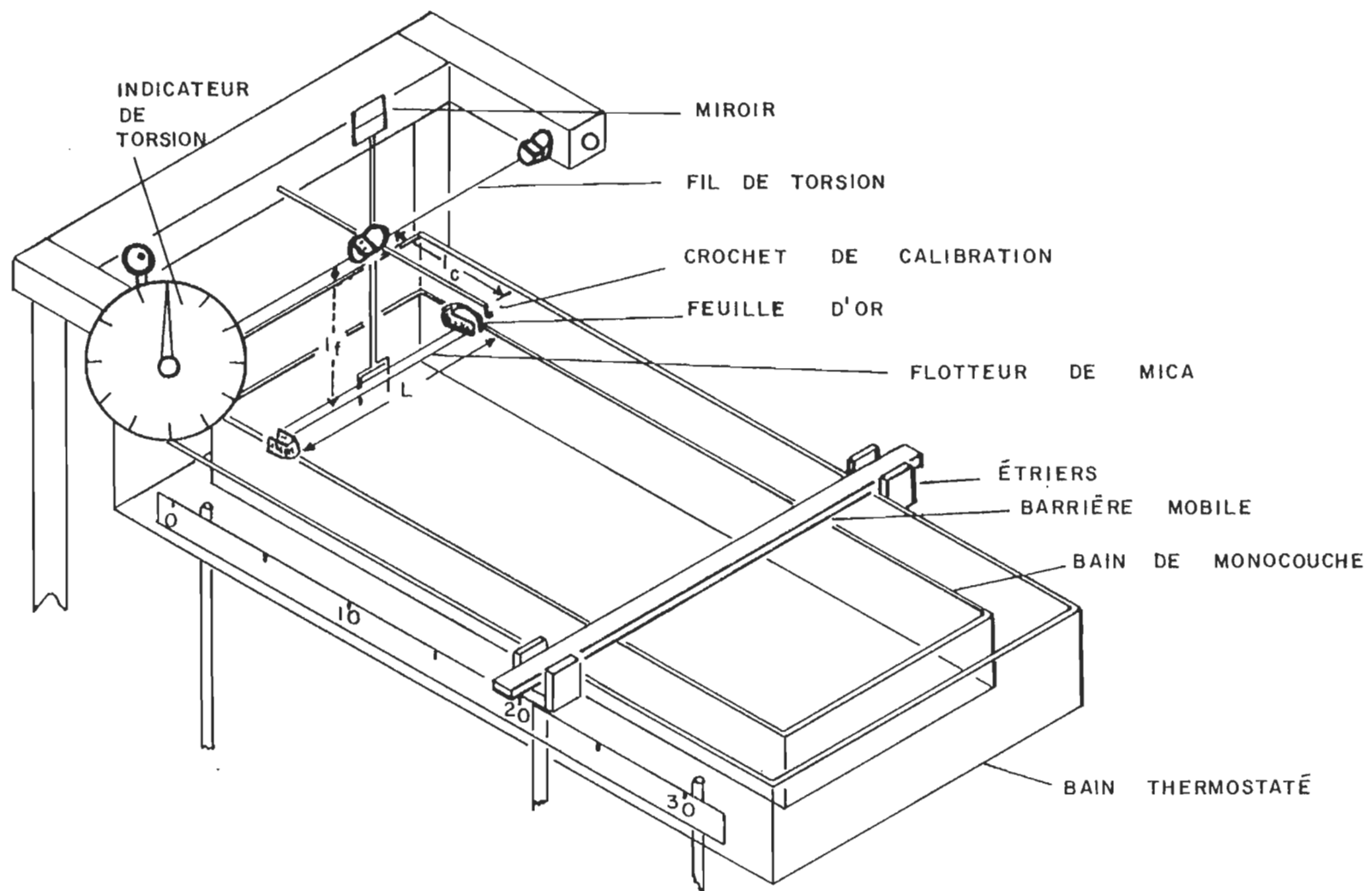


Figure 10. Schéma d'un bain de Langmuir

assurée par un mécanisme qui est présenté à la figure 11. Une vis sans fin de 10 filets par centimètre est placée sous le bain et elle est reliée aux étriers. Cette vis peut être actionnée manuellement ou à l'aide d'un système automatique.

Le système de détection est muni d'un fil de torsion soit en acier, nickel, molybdène ou tungstène d'un diamètre connu. Le fil est d'une importance capitale lors des manipulations, on doit éviter d'appliquer une trop grande torsion ce qui pourrait le déformer et changer ses propriétés physiques. On mesure la torsion appliquée sur le fil par un mécanisme situé à l'extrémité d'attachement du fil; il comporte un cadran circulaire gradué permettant d'enregistrer la déviation en degré. La figure 12 montre les parties principales du système de détection. Au centre du fil de torsion est attaché le balancier. Le balancier est en forme de T qui se divise en deux parties: (i) le bras de levier, parallèle au bain d'une longueur de 7.5 cm. A son extrémité, un crochet servant à soutenir les poids pour calibrer le système; (ii) le bras vertical, perpendiculaire au bain, d'une longueur de 8.95 cm. Sa base est munie d'une fourchette qui transperce le flotteur à la surface de l'eau. La fourchette est de 1 cm de haut par 6.4 cm de large. Le bras vertical se continue de l'autre côté du fil de torsion pour se terminer à un petit miroir qui reçoit le faisceau lumineux et le reflète sur un panneau gradué. A la surface de l'eau, le bras vertical transperce, à deux endroits, un flotteur de mica. Le mica est hydrophobe donc il flotte à la surface de l'eau. Il a une longueur de 12.8 cm, une largeur

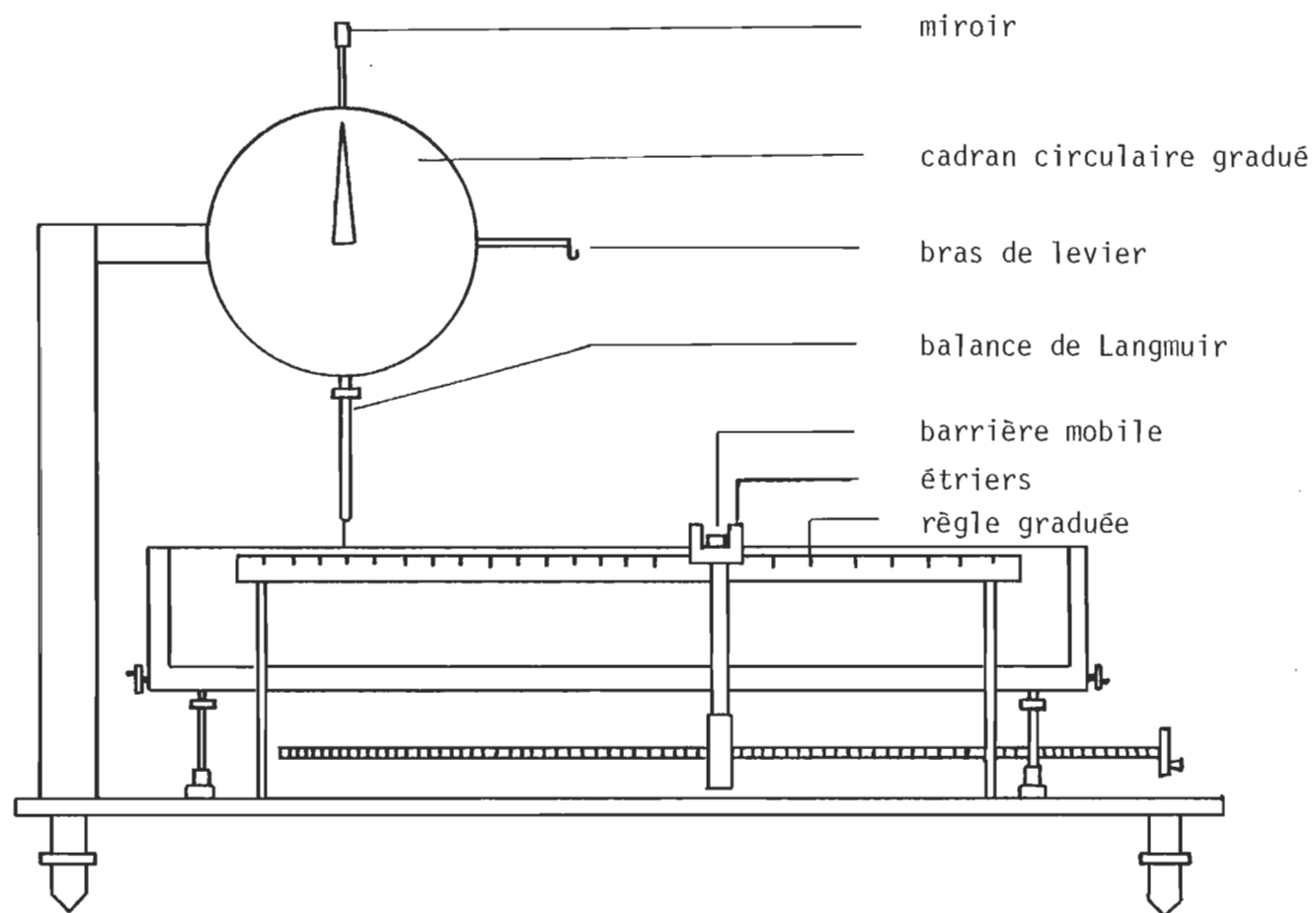


Figure 11. Système de Langmuir, vué de profil

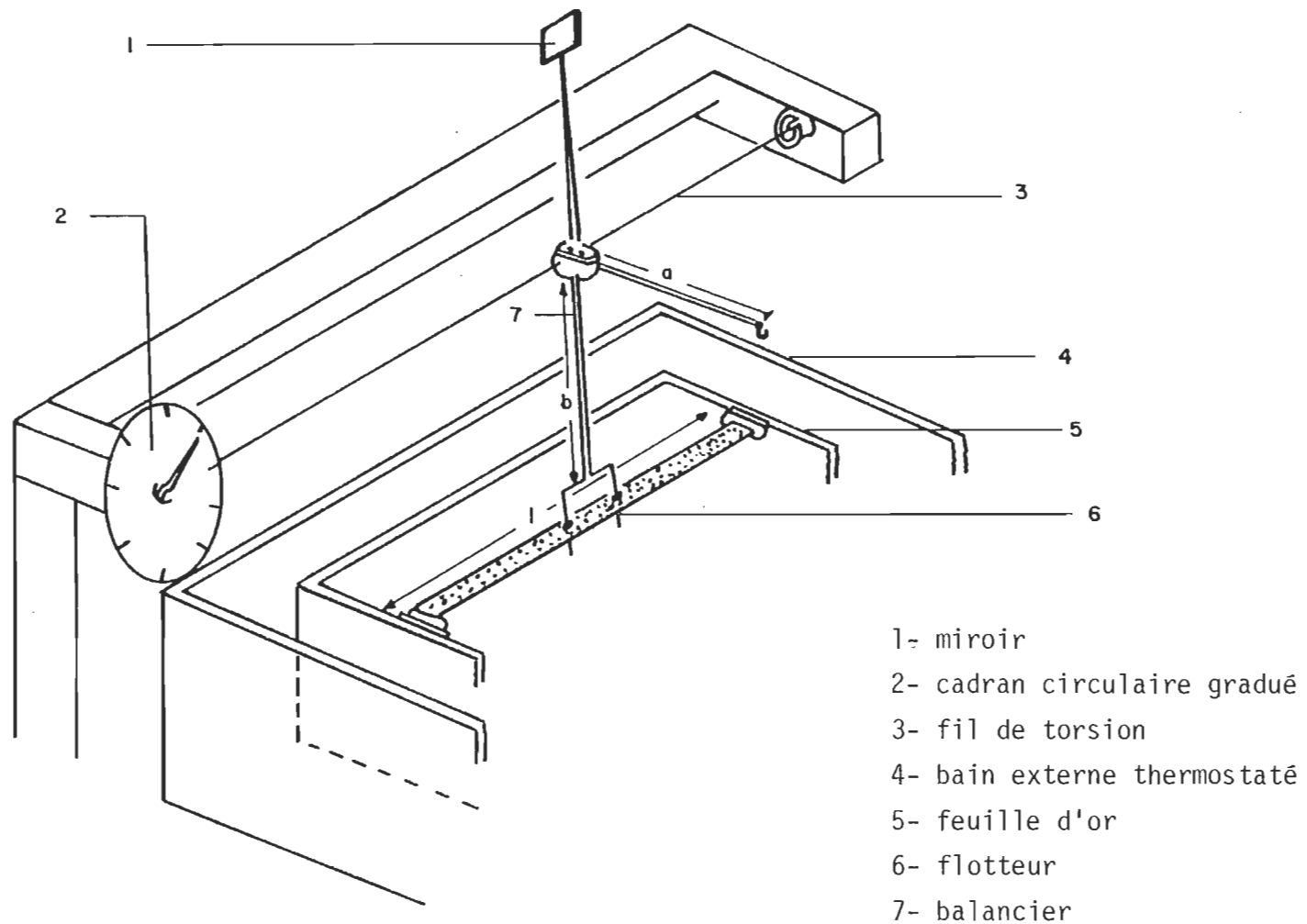


Figure 12. Système de détection

de 0.8 cm et une épaisseur de 0.0085 cm. Il est rattaché au bain par deux feuilles d'or de 4.0 cm de long par 0.8 cm de large. Ces feuilles d'or sont soigneusement collées aux parois du bain ainsi qu'aux extrémités du mica avec de la cire. L'utilisation de feuilles d'or permet au mica de flotter librement. Sur le côté du bain, une règle graduée en millimètre permet de calculer la surface occupée par les molécules lors de la compression.

L'ensemble du système est recouvert d'une cage de Plexiglass pour protéger la monocouche des contaminations externes (exemple, poussières). On a accès à la surface du bain par un couvercle situé sur le dessus de la cage permettant ainsi les différentes manipulations (déposition, succion). Le tout est logé dans une salle de monocouches de 1.8 x 1.5 x 1.2 m ce qui permet de contrôler les poussières, la température et la lumière.

2.3.2 Purification de l'eau

La caractéristique principale de l'étude de monocouches à l'interface air/eau, est la qualité de l'eau. Comme source nous utilisons l'eau de la municipalité de Trois-Rivières qui est par la suite purifiée. L'eau est acheminée dans un système millipore de type Super Q (SQ) pouvant produire une eau d'une pureté extrêmement élevée exempte de contaminants ioniques, de particules et de microbes. Le millipore

SQ consiste en un assemblage de quatre cartouches fonctionnant en série. La première cartouche (MF-Lifeguard) sert de préfiltration permettant d'enlever les matières en suspension contenues dans l'eau. Le second élément est une cartouche (Super-C) qui adsorbe la matière organique au moyen de charbon activé. Cette cartouche a une forte capacité d'adsorption, car la surface de contact des granules de charbon est très grande. La troisième cartouche du système est une échangeuse d'ions. Les ions libres à l'intérieur de la colonne participent aux réactions chimiques en neutralisant les acides et les bases. On peut vérifier la résistivité de cette colonne en tout temps en utilisant un Meg-O-Meter, la valeur normale se situe à $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$. Le dernier élément est un millitube (MF) qui enlève toutes particules microscopiques de diamètre supérieur aux pores de la membrane (0.22 à $1.22 \text{ }\mu\text{m}$). Ce système produit un débit de $60 \text{ litres heure}^{-1}$, l'eau ainsi purifiée donne une résistance spécifique $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ et une tension superficielle de 67.4 mN m^{-1} . Ces deux critères sont les plus appropriés pour vérifier la pureté de l'eau.

De plus, l'eau obtenue du système SQ a été distillée avant son utilisation. Nous avons utilisé deux systèmes différents pour la distillation. Le premier, un système à triple distillations comprend trois ballons de trois litres fonctionnant en série et reliés les uns aux autres par des colonnes à distiller remplies de billes de 5 mm de diamètre (Taylor, 1960). On chauffe avec une mante électrique; un rhéostat permet de contrôler la température. Afin d'oxyder les matières organiques, de neutraliser l'eau et d'éliminer les amines, on ajoute

dans le premier ballon du permanganate de potassium, de l'hydroxyde de sodium ou de l'acide sulfurique. Pour enlever les dernières poussières, on filtre avec un millipore $0.22 \mu\text{m}$. Après traitement, on obtient de l'eau ayant les propriétés suivantes: résistance spécifique $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, tension superficielle 67.5 mN m^{-1} .

Le second système que l'on a utilisé est nouveau, il est complètement en quartz. Le Bi-18 de Brinkman comprend deux compartiments à distillation continue, sa capacité est de $1.8 \text{ litre heure}^{-1}$. L'eau a une résistivité $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ et la tension de surface se situe à 68.20 mN m^{-1} . Lorsque l'on distille l'eau du système millipore avec le système en quartz Bi-18, on obtient une eau de très bonne qualité. Pour de plus amples informations sur la purification de l'eau pour la technique des monocouches, voir Munger (1978).

2.3.3 Principe de la technique des monocouches

On remplit le bain de téflon avec de l'eau pure. Préalablement, on doit s'assurer que le bain a été bien lavé à l'éther diéthylique. Les pièces venant en contact avec le bain, soit le flotteur et la barrière mobile doivent être dégraissées et rincées plusieurs fois avec de l'eau purifiée.

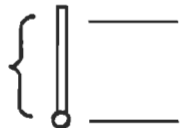
La deuxième étape consiste à nettoyer la surface du bain par suction. A l'aide d'une pipette pasteur reliée à un système à vide, on suctionne les poussières et autres impuretés à la surface de l'eau. Il est

très important de bien nettoyer la surface avant et arrière du flotteur de mica; de cette façon, on est certain qu'il n'y a aucune tension appliquée sur le système. A ce moment, on ajuste le zéro en dirigeant le faisceau lumineux sur le miroir qui lui le réfléchit sur un écran disposé à cette fin. Sur cet écran, il y a une droite horizontale ajustable. Lorsque le système est bien nettoyé, on ajuste le faisceau lumineux sur la droite et on place le cadran gradué à zéro degré. Le système est prêt à fonctionner.

La première étape est de vérifier la pureté du solvant. A cet effet, on dépose à la surface du bain 100 μ l de solvant, soit l'éther diéthylique, à l'aide d'une microseringue. Le solvant s'évapore, on doit avoir une compression sans déviation significative du flotteur ce qui signifie que la surface est propre.

La déposition d'une monocouche à l'interface air/eau s'exécute comme suit: On dépose environ 100 μ l d'une solution à l'aide d'une microseringue située à 2-3 cm de la surface, on injecte environ 5 μ l à la fois et on attend que le faisceau lumineux revienne au zéro à chaque déposition. Comme on peut le remarquer à la figure 13, voir (1), les molécules occupent une surface maximum entre la barrière mobile et le flotteur. La quantité déposée doit être suffisante pour que chacune des molécules ait un espace tel que la pression exercée sur le flotteur soit nulle. Les molécules au départ ont une orientation et une disposition quelconque à l'interface air/eau. La compression de la monocouche à l'aide de la barrière mobile, redresse les molécules qui s'accolent

molécule d'acide gras



queue hydrophobe

tête polaire

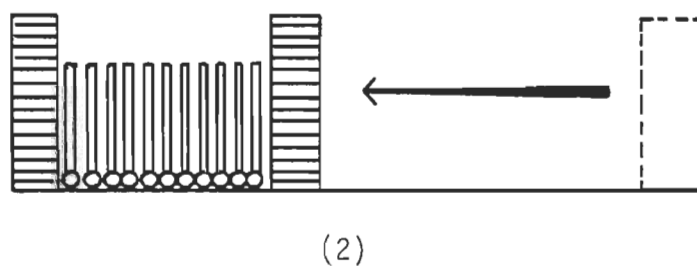
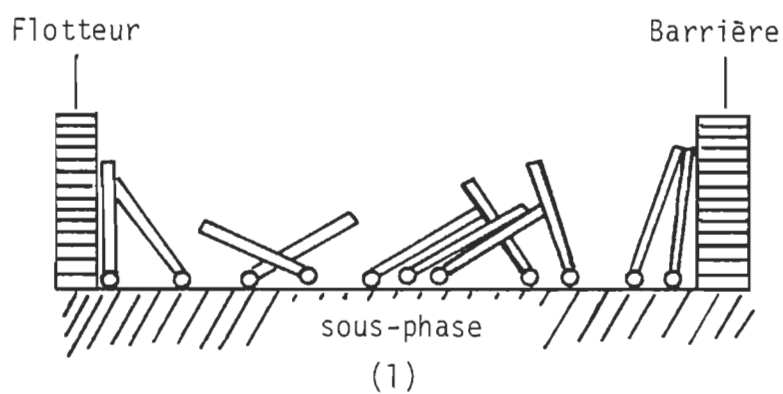


Figure 13. Diagramme montrant l'orientation de molécules d'acides gras en monocouche: avant (1) et après (2) compression

les unes aux autres: leurs têtes polaires dans la phase aqueuse et leurs queues lipidiques à l'extérieur (figure 13, voir 2). Au même moment ces molécules appliquent une force sur le flotteur que l'on corrige en appliquant une torsion sur le fil. Cette torsion est mesurée en degré (θ). Ainsi, on est en mesure de porter sur graphique la force appliquée (F) en fonction de l'aire moléculaire (A), c'est la courbe de pression de surface. On remarque lors de la compression que si on dépasse l'aire moléculaire limite (caractéristique à chaque substance), on obtient la région du collapse. A cette pression, il y a chevauchement des molécules, donc nous n'avons plus de monocouche.

2.3.4 Etalonnage

A l'aide de poids dont on connaît la pesée avec précision, on calibre le système afin d'obtenir la sensibilité. On remplit le bain d'eau purifiée, on nettoie la surface. La barrière mobile est avancée de façon à ce que la surface avant du flotteur soit égale à la surface arrière. On ajuste le faisceau lumineux et le cadran qui mesure la torsion du fil. Nous sommes alors en mesure de commencer la calibration.

La calibration se fait comme suit: on accroche au crochet du bras horizontal des poids de plus en plus lourds et on enregistre la déviation en degré. Lorsque l'on dépose un poids, tout le système est déplacé: le point lumineux est dévié de son zéro et on le ramène en appliquant une torsion sur le fil qui est mesurée en degré.

Après chaque mesure, on enlève le poids et on ramène le système au zéro pour noter si le balancier répond toujours bien. A l'aide des différents paramètres mécaniques, on peut calculer la sensibilité du système. On porte sur un graphique les résultats obtenus pour une force appliquée (P) en fonction de la déviation en degré (θ). La pente de cette droite (P/ θ) est utilisée pour obtenir la sensibilité exprimée par l'équation suivante:

$$S = \frac{P}{\theta} \cdot \frac{g \cdot L_c}{L_f \cdot L}$$

S = sensibilité en (mN m⁻¹ degré⁻¹)

P = poids (gramme)

θ = déviation (degré)

g = constante universelle de gravitation (980 x 10⁻² mN g⁻¹)

L_c = longueur du bras horizontal (cm), voir figure 10

L_f = longueur du bras vertical (cm)

L = longueur efficace du flotteur = longueur du flotteur + $\frac{1}{2}$ distance entre le flotteur et la paroi du bain à gauche du flotteur + $\frac{1}{2}$ distance entre le flotteur et la paroi à droite du flotteur (cm).

2.3.5 Isotherme de pression de surface

2.3.5.1 Standardisation

L'acide arachidique est une substance qui a été fort étudiée en monocouche, c'est pourquoi nous l'avons employé pour standardiser le système.

Les conditions expérimentales sont les suivantes:

Solution acide arachidique	: 10^{-3} M
Déposition	: 100 μ l
Sous-phase	: CdCl_2 10^{-3} M

On obtient des résultats comparables à ceux de la littérature (Gaines Jr., 1966).

2.3.5.2 Isotherme des polyènes

La déposition des molécules de rétinals et rétinols à l'interface air/eau se fait de la même façon que pour l'acide arachidique. Cependant, il faut prendre note que les chromophores de pigments visuels sont très sensibles à la lumière et à la chaleur. On doit travailler dans une chambre noire, thermostatée (294 ± 1 K) et changer le faisceau lumineux du système pour un faisceau rouge, les molécules n'absorbent pas dans le rouge. Toutes les solutions sont préparées dans l'éther diéthylique Aristar.

Pour débiter, nous avons répété les expériences faites par Hotchandani et coll. en 1975. Ce travail permettait de vérifier le système et la stabilité des pigments.

2.4 Dépôt de monocouche et multicouche

La dépôt de monocouches permet de transférer les molécules se trouvant à l'état monomoléculaire à l'interface air/eau sur un support solide (interface air/solide) ce qui nous permet d'effectuer des mesures spectroscopiques.

2.4.1 Technique de dépôt

La dépôt se fait à l'aide du système décrit à la partie 2.3. On utilise un moteur à dépôt ou moteur à rotation (0.22 rpm). On fixe à ce moteur une tige de métal avec une pince à ressort à son extrémité permettant d'insérer une lamelle. La lamelle est placée à 1 cm de la surface du bain; elle passe par une ouverture qui a été découpée dans le couvercle de Plexiglass.

Pour déposer les molécules sur la lamelle, on actionne le moteur, la lamelle descend dans le bain et remonte sur une distance d'environ 3.0-3.5 cm. Les molécules s'attachent à la surface de la lamelle et on doit actionner la barrière mobile de façon à garder la tension de surface constante lors de la dépôt.

2.4.2 Choix de la pression de surface

L'isotherme de pression de surface permet de choisir dans quelle région nous allons effectuer la dépôt. Normalement, on travaille à une pression située tout juste avant le collapse, c'est dans cette région que

les molécules ont le plus grand ordre monomoléculaire sans qu'il n'y ait de chevauchement. On remarque à la figure 14, la différence schématique entre une déposition près du collapse et une déposition à de très basses pressions de surface. On remarque dans le premier cas, un arrangement régulier des molécules tandis que dans le deuxième cas, les molécules se trouvent dans un état désordonné.

2.4.3 Support solide

Les lamelles utilisées pour la déposition sont les mêmes que pour la préparation des films solides. Nous avons utilisé des lamelles soit de surface hydrophile ou hydrophobe.

Le comportement des molécules lors d'une déposition à l'interface air/solide suit différents processus qui dépend de la molécule utilisée et de l'adsorption de celle-ci sur la lamelle.

Voici quelques définitions de différents types de déposition:

(i) la déposition en Y lorsqu'il y a déposition dans les phases de descente et de montée de la lamelle; (ii) la déposition en X lorsqu'il y a déposition seulement dans la phase de descente et non celle de la montée; (iii) la déposition en Z lorsqu'il y a déposition seulement dans la phase de montée et non celle de descente. La figure 15 présente les dépositions en X, Y et Z (Gaines Jr., 1966).

Quant au rapport de déposition, il se définit comme étant le rapport entre les molécules qui sont adsorbées sur la lamelle et celles qui ont quitté le bain. Un rapport de déposition considéré comme bon se situe

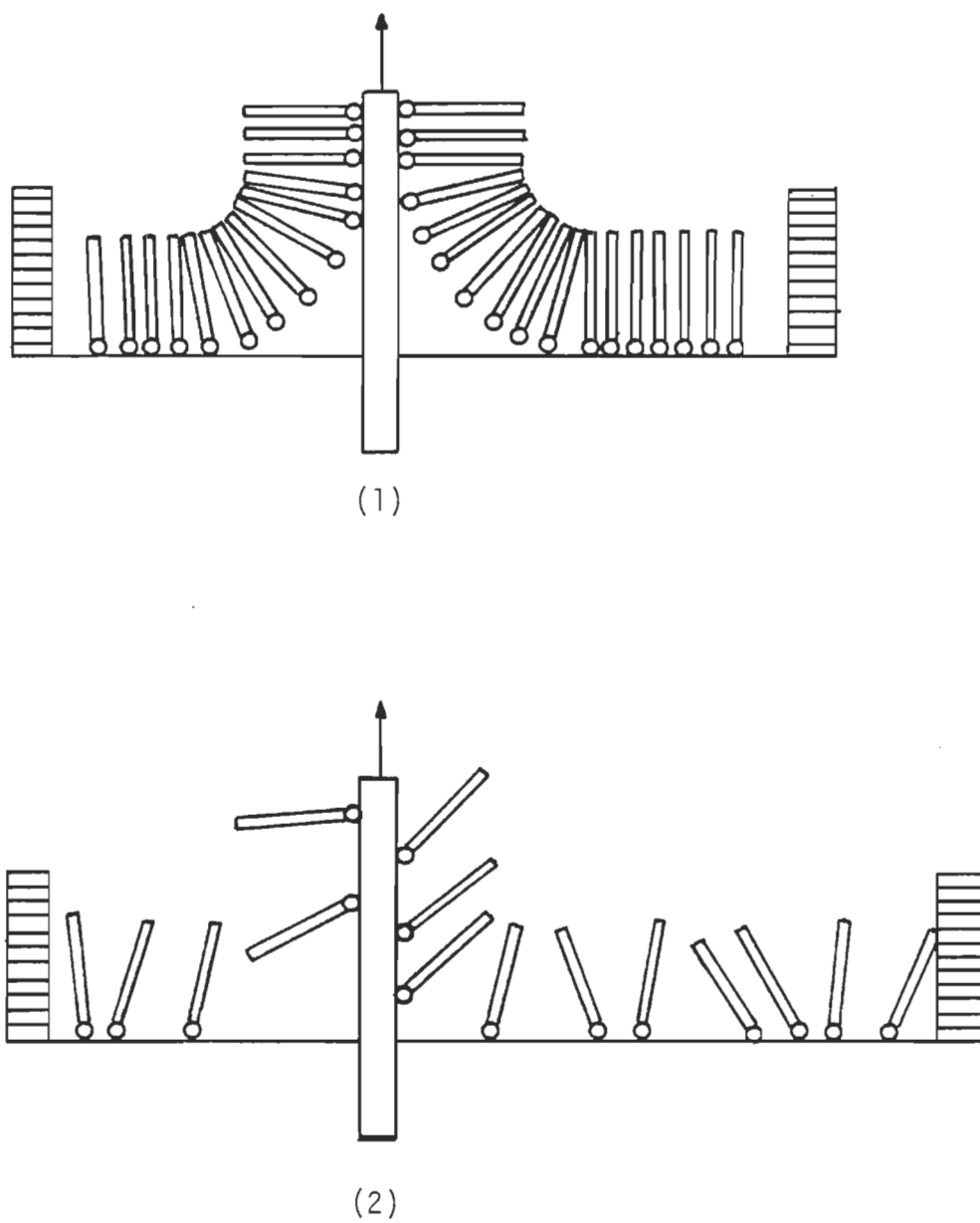


Figure 14. Orientation des molécules lors de la déposition à forte pression de surface (près du collapse, 1; faible pression de surface, 2)

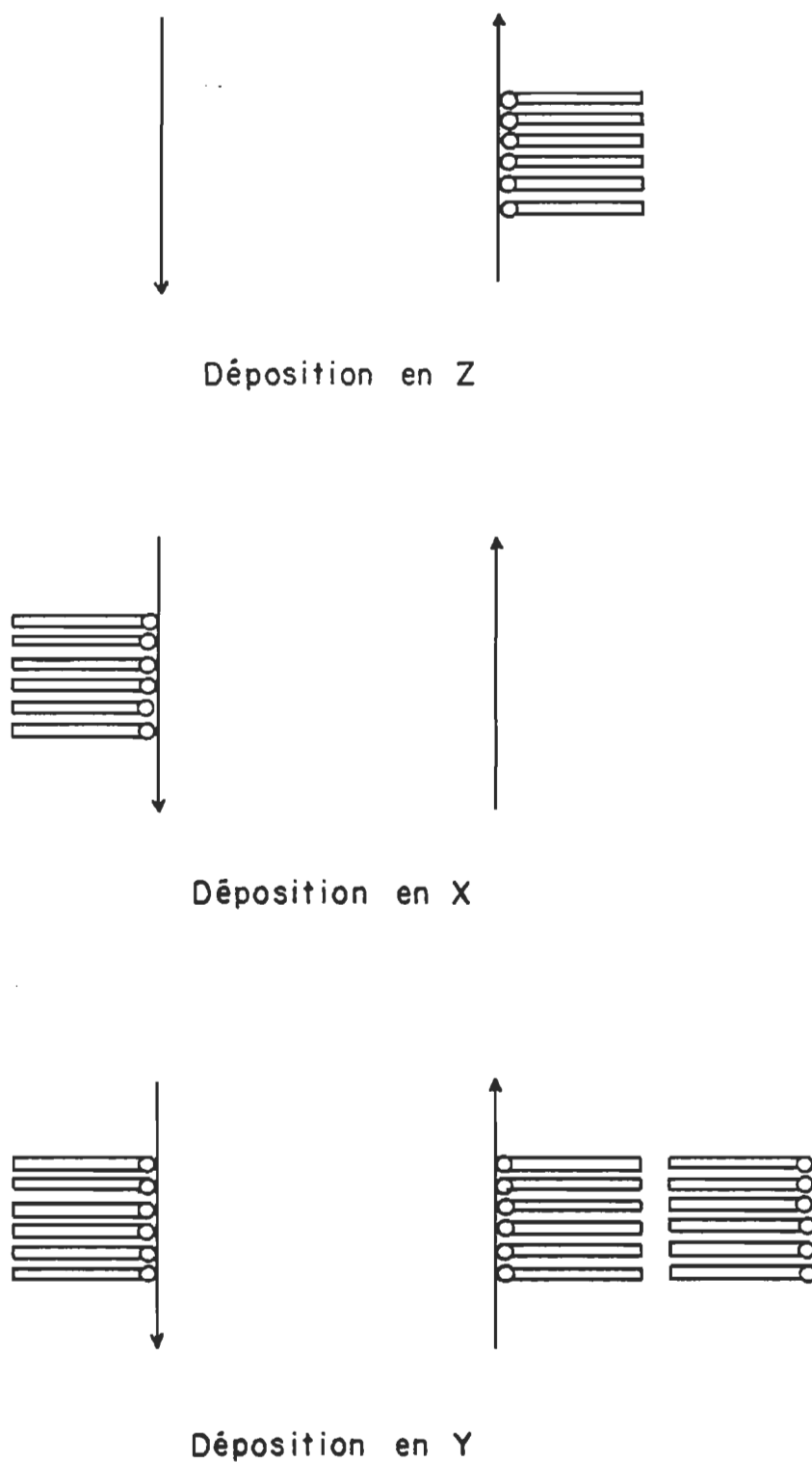


Figure 15. Types de déposition: X, Y et Z (Gaines, G.L. Jr., 1966)

entre 0.9 et 1.1. Le calcul de ce rapport se fait à l'aide de l'équation suivante,

$$\text{Rapport de déposition} = \frac{\text{Surface du bain balayée par la barrière mobile lors de la compression}}{2 \text{ fois surface de la lamelle qui a été immergée}}$$

2.5 Spectroscopie

Afin de déterminer les différents paramètres physico-chimiques des molécules étudiées, on a eu recours à des études spectroscopiques.

2.5.1 Absorption

Les spectres des composés étudiés ont été enregistrés pour des solutions, des films solides et des monocouches. L'appareil est un Coleman 124 muni d'un photomultiplicateur HTV R136.

Des cellules de quartz pour spectrophotométrie ayant un parcours optique de 5 et 10 mm ont été employées pour les solutions. Dans le cas des films et des monocouches, nous avons utilisé un support spécial pour insérer les lamelles. Ce support est présenté à la figure 16, il a été fabriqué dans nos ateliers. Ce support permet d'utiliser une ou plusieurs lamelles de quartz pour enregistrer les spectres de film solide ou de monocouche.

2.5.2 Fluorescence

Pour les mesures d'excitation et d'émission de fluorescence, on a utilisé un spectrofluorimètre Perkin Elmer MPF-2A muni de monochromateurs pour l'excitation et l'émission et d'un photomultiplicateur RCA-136.

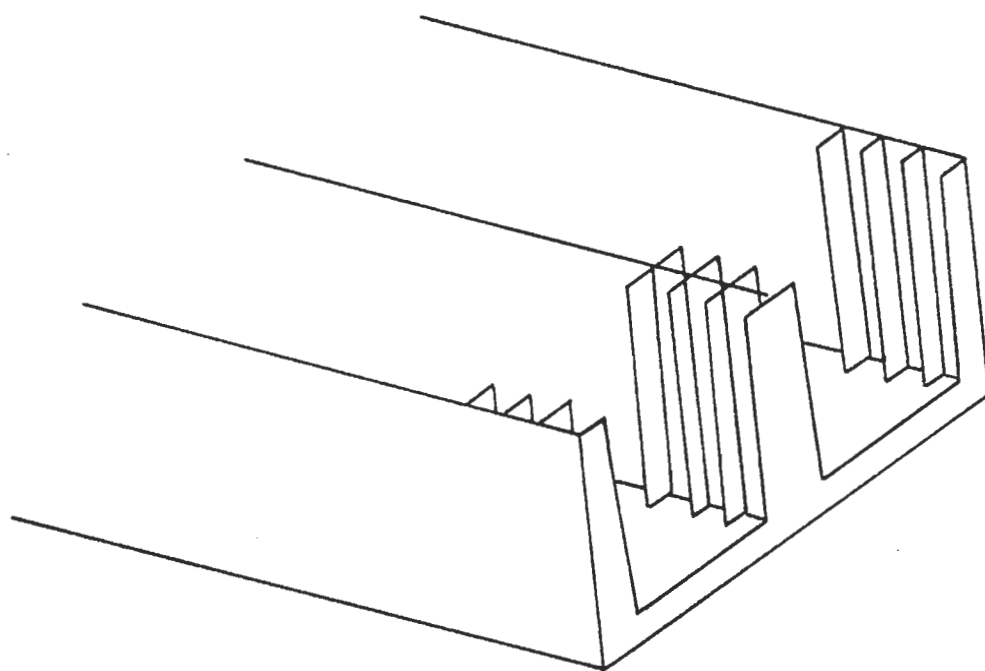


Figure 16. Support à lamelles pour spectrophotomètre uv-visible

Les spectres en solution sont pris à l'aide de cellules de 10 mm spécialement conçues pour la fluorescence. Elles ont les quatre faces transparentes ce qui permet d'enregistrer la fluorescence émise à angle de 90^0 . Quant aux films solides et aux monocouches, on a utilisé un support spécial qui a été fabriqué dans nos ateliers. Ce support permet d'orienter la lamelle face au faisceau lumineux.

Des mesures de polarisation ont été prises en utilisant la méthode de Albrecht (1961). Le degré de polarisation (P) de la luminescence est déterminé à l'aide de l'équation,

$$P = \frac{I_{EE} - I_{EB} (I_{EE}/I_{EB})}{I_{EE} + I_{EB} (I_{BE}/I_{BB})}$$

où I_{EE} et I_{EB} réfèrent à l'intensité de la fluorescence polarisée émise parallèle et perpendiculaire respectivement à la lumière d'excitation. Le terme I_{BE}/I_{BB} est un facteur de correction qui tient compte de la transmission sélective du monochromateur pour l'émission et l'excitation ainsi que de la réflectance de la lamelle et d'autres accessoires du système optique. Les mesures d'intensité de fluorescence I_{EE} , I_{BE} , I_{EB} et I_{BB} ont été effectuées comme suit: l'échantillon a été excité avec le polarisateur d'excitation à une orientation E et le spectre de fluorescence a été enregistré avec le polariseur analytique à des orientations E et B.

L'intensité de la lumière émise est représentée par les signes I_{EE} et I_{EB} . Ils représentent les intensités de la lumière émise

(fluorescence) polarisée parallèle, I_{11} , et perpendiculaire, I_1 , à la lumière d'excitation.

Ensuite, le polariseur d'excitation est placé dans l'orientation B, le spectre de fluorescence est enregistré avec le polariseur analytique en orientation E et B. L'intensité de la lumière émise est désignée par I_{BE} et I_{BB} .

Le rapport I_{BE}/I_{BB} définit le facteur de correction (vide supra).

On exprime aussi le degré de polarisation par l'expression,

$$P = \frac{I_{11} - I_1}{I_{11} + I_1} = \frac{I_{EE} - I_{EB}}{I_{EE} + I_{EB}}$$

En tenant compte du facteur de correction, on obtient l'équation donnée à la page précédente, soit

$$P = \frac{I_{EE} - I_{EB}}{I_{EE} + I_{EB}} \frac{(I_{BE}/I_{BB})}{(I_{BE}/I_{BB})}$$

où E est l'orientation du vecteur électrique perpendiculaire au plan formé par le faisceau d'excitation et le faisceau d'observation et B est l'orientation du vecteur électrique parallèle au plan formé par le faisceau d'excitation et le faisceau d'observation.

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1 Chromatographie sur couche mince du 11-cis rétinol et de ses isomères

Pour la séparation et la purification des rétinals et des rétinols, nous avons utilisé la technique de chromatographie sur couche mince. Suite à maintes modifications des conditions expérimentales, nous avons retenu quatre chromatogrammes permettant de séparer et d'identifier les différentes isomères. Les résultats de ces différents chromatogrammes apparaissent ci-dessous.

3.1.1 Chromatogrammes

CHROMATOGRAMME I

Types de composé	:	Rétinols et rétinals
Référence	:	John et coll., (1965)
Adsorbant	:	Gel de silice GF-254
Grosseur des pores	:	250 μm
Préparation et séchage	:	Plaques préparées commercialement et séchées 2 heures à 120°C
Chambre de saturation	:	Chambre cylindrique, le solvant est ajouté environ 1 heure avant chromatographie pour saturation
Distance parcourue par le solvant	:	15 cm
Temps	:	60 min

Composition du solvant : Volume total 31 ml; mélange
3% acétone dans iso-octane

Solvant et solution utilisés pour application : Les pigments sont dissous
dans l'éther diéthylique ou
éther de pétrole, concentra-
tion $\approx 10^{-3}$ M

<u>Substances</u>	<u>R_f</u>	<u>Ecart type</u>	<u>Référence R_f</u>
Tout-trans rétinal	0.22	0.04	0.21
9-cis rétinal	0.25 ₆	0.05	
11-cis rétinal	0.33	-	
13-cis rétinal	0.30	0.04	
Tout-trans rétinol	0.07	0.01	0.08
Tout-trans rétinol acétate	0.46	-	0.47

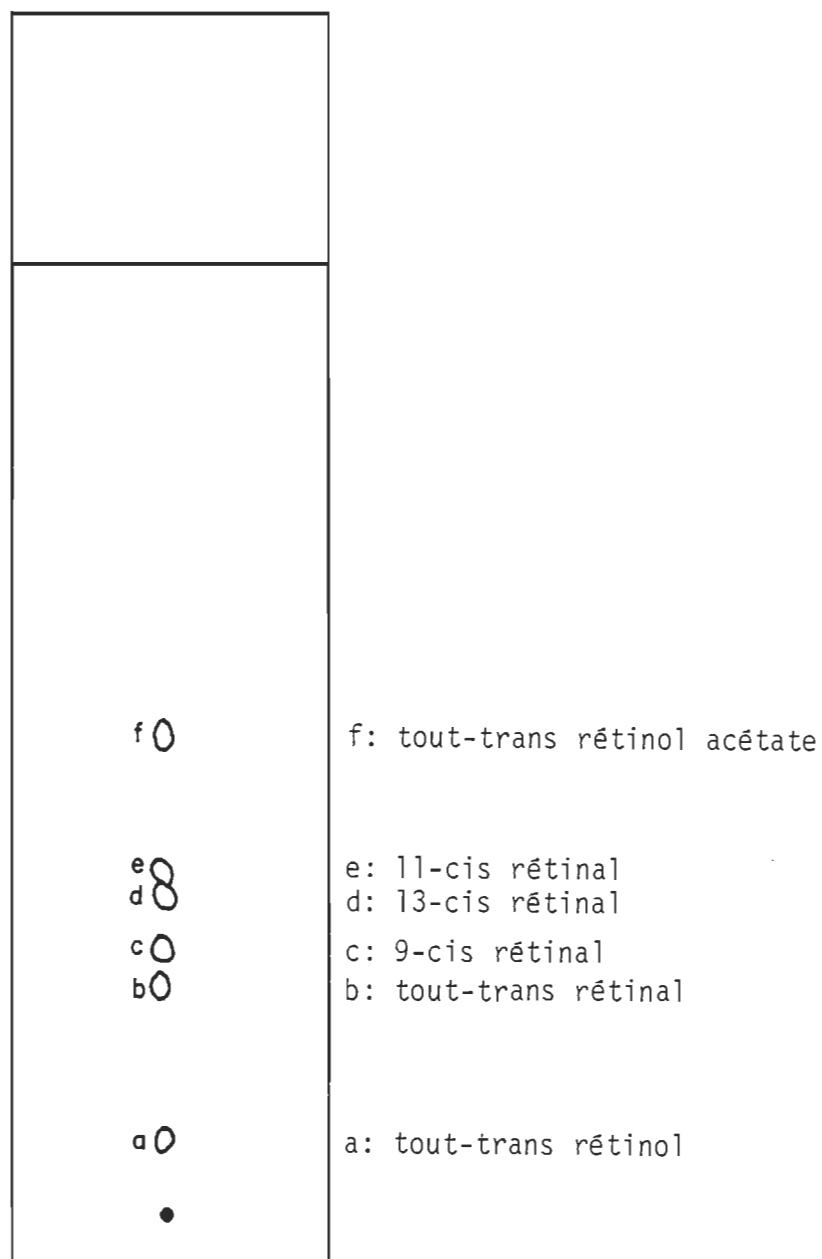


Figure 17. Plaque chromatographique des rétinals et des rétinoles
(éluant: 3% acétone dans iso-octane)

CHROMATOGRAMME 2

Types de composé	:	Rétinals
Référence	:	Futterman et coll., (1973, 1974)
Adsorbant	:	Gel de silice GF-254
Grosseur des pores	:	250 μm
Préparation et séchage	:	Plaques préparées commercialement et séchées 2 heures à 120°C
Chambre de saturation	:	Chambre cylindrique, le solvant est ajouté environ 1 heure avant la chromatographie pour saturation
Distance parcourue par le solvant	:	15 cm
Temps	:	60 min
Composition du solvant	:	Volume total 31 ml; mélange 15 % éther diéthylique dans éther de pétrole
Solvant et solution utilisés pour application	:	Les pigments sont dissous dans l'éther diéthylique ou éther de pétrole, concentration $\approx 10^{-3}\text{M}$.

<u>Substances</u>	<u>R_f</u>	<u>Ecart type</u>	<u>Référence R_f</u>
Tout-trans rétinal	0.387	0.050	0.23
9-cis rétinal	0.446	0.046	0.32
11-cis rétinal	0.563	0.036	0.35
13-cis rétinal	0.585	0.054	0.40

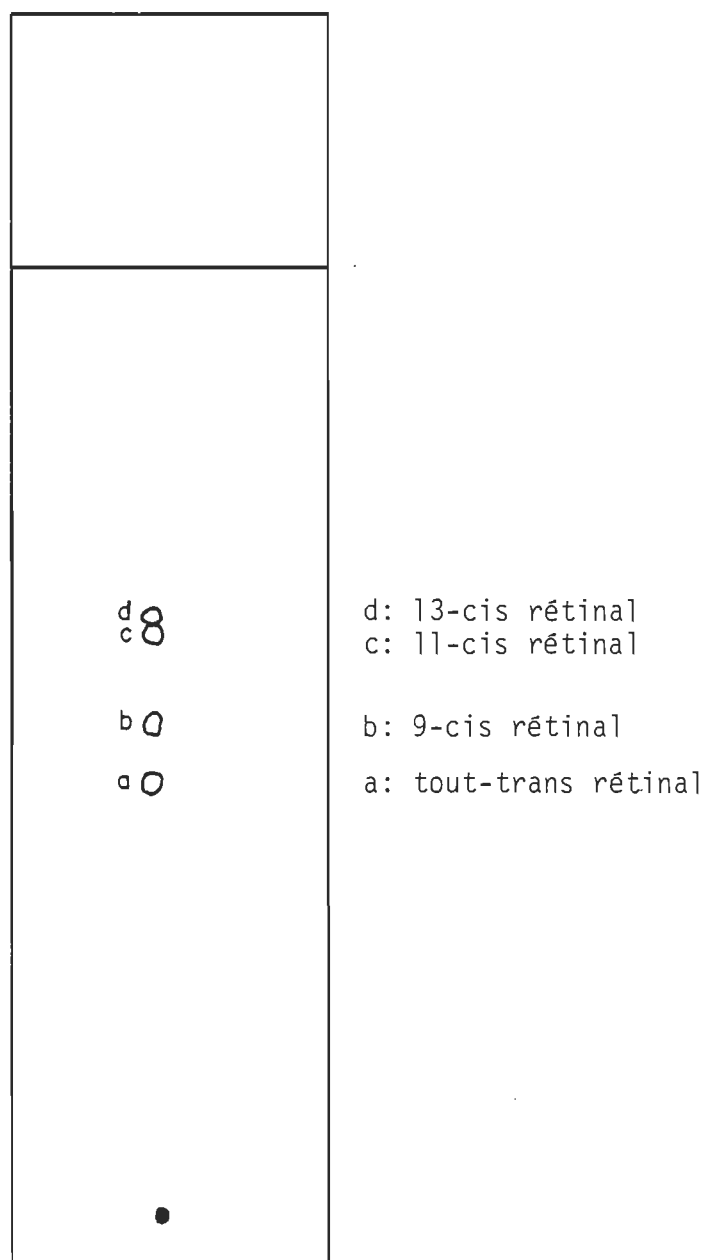


Figure 18. Plaque chromatographique des rétinaux (éluant: 15% éther diéthylique dans éther de pétrole)

CHROMATOGRAMME 3

Types de composé	:	Rétinals
Référence	:	Futterman et coll. (1973, 1974)
Adsorbant	:	Gel de silice GF-254
Grosseur des pores	:	250 μm
Préparation et séchage	:	Plaques préparées commercialement et séchées 2 heures à 120°C
Chambre de saturation	:	Chambre cylindrique, le solvant est ajouté environ 1 heure avant la chromatographie pour saturation
Distance parcourue par le solvant	:	15 cm
Temps	:	60 min
Composition du solvant	:	Volume total 31 ml; mélange 20 % éther diéthylique dans éther de pétrole
Solvant et solution utilisés pour application	:	Les pigments sont dissous dans éther diéthylique ou éther de pétrole, concentration $\approx 10^{-3}$ M

<u>Substance</u>	<u>R_f</u>	<u>Ecart type</u>	<u>Référence R_f</u>
Tout-trans rétinal	0.500	0.023	0.29
11-cis rétinal	0.615	0.025	0.46
13-cis rétinal	0.645	0.028	0.48

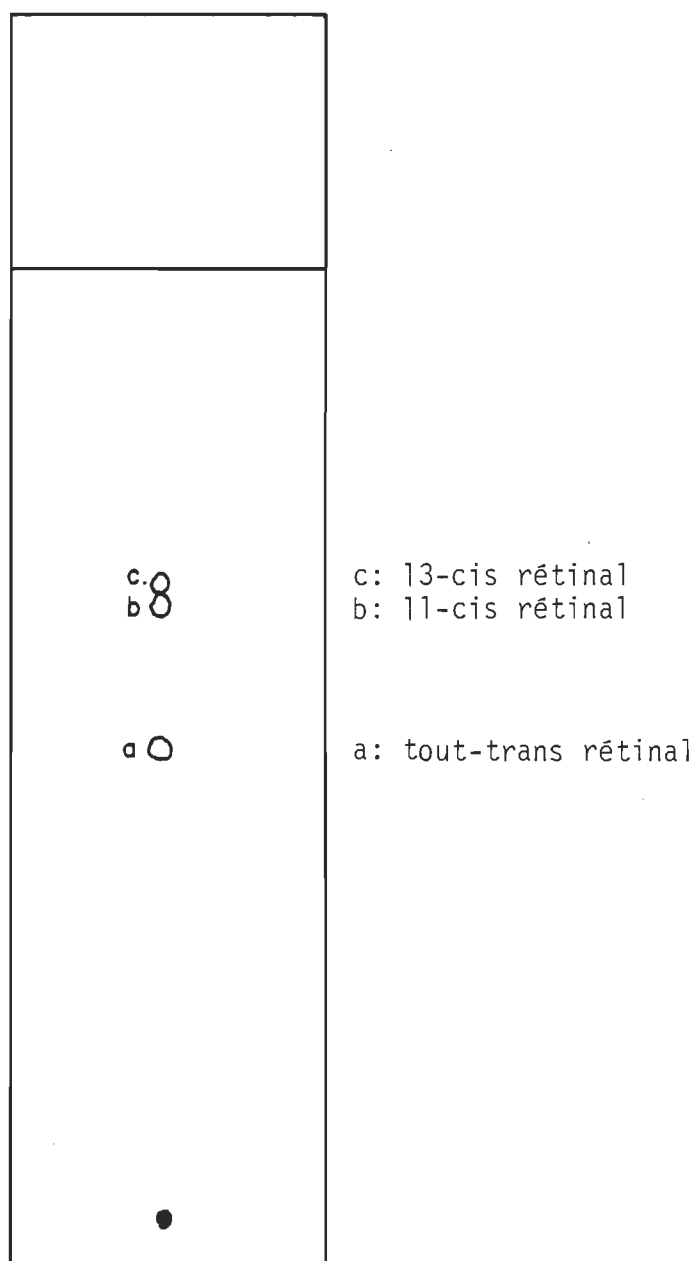


Figure 19. Plaque chromatographique des rétinals (éluant: 20% éther diéthylique dans éther de pétrole)

CHROMATOGRAMME 4

Types de composé	:	Rétinals et rétinoles
Référence	:	nil
Adsorbant	:	Acide polysilicique
Grosseur des pores	:	Feuilles imprégnées d'acide polysilicique
Préparation et séchage	:	Aucune
Chambre de saturation	:	Chambre cylindrique, le solvant est ajouté environ 1 heure avant chromatographie pour saturation
Distance parcourue par le solvant	:	15 cm
Temps	:	25 min
Composition du solvant	:	Volume total 31 ml; mélange 8 % éther diéthylique dans éther de pétrole
Solvant et solution utilisés pour application	:	Les pigments sont dissous dans l'éther diéthylique ou éther de pétrole, concentration $\approx 10^{-3}$ M

<u>Substances</u>	<u>R_f</u>	<u>Ecart type</u>
Tout-trans rétinal	0.420	0.020
9-cis rétinal	0.546	0.019
11-cis rétinal	0.546	0.019
Tout-trans rétinol	0.200	0.020

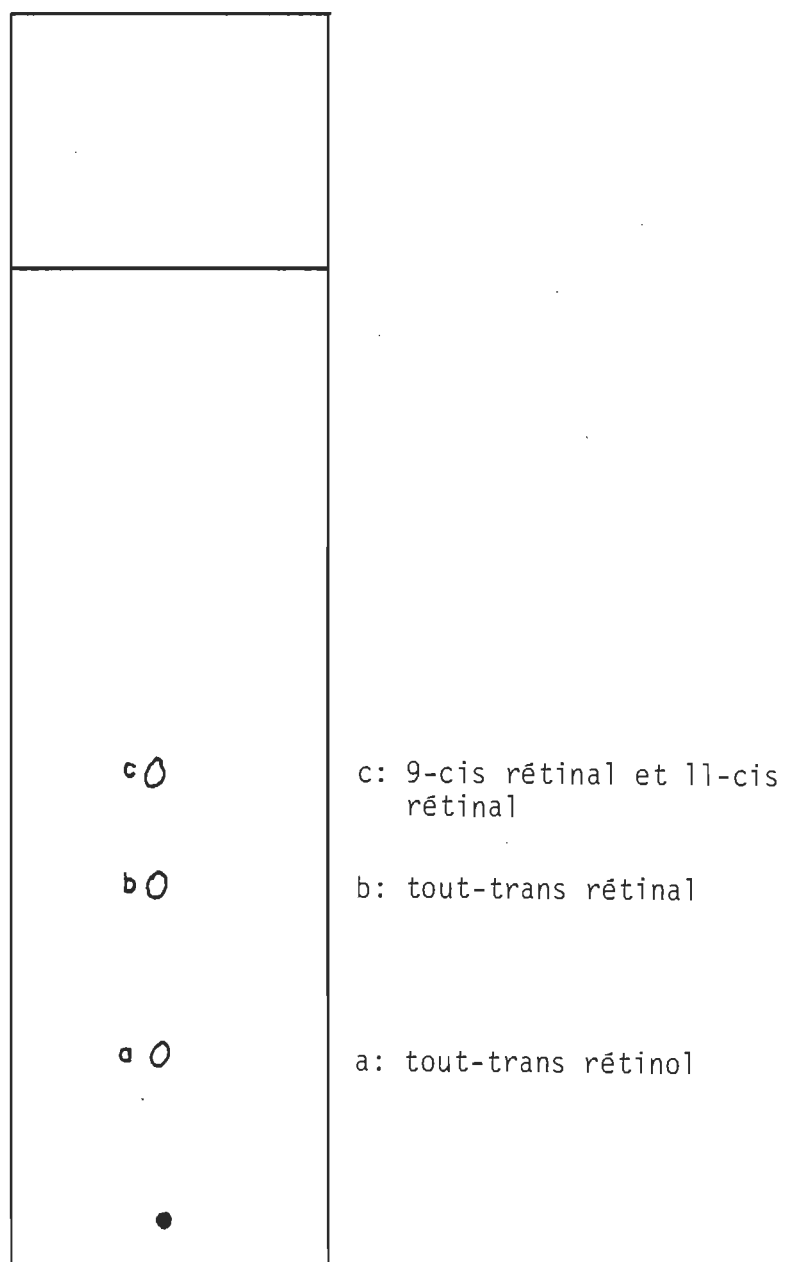


Figure 20. Plaque chromatographique des rétinals et des rétinols
(éluant: 8% éther diéthylique dans éther de pétrole)

3.1.2 Etude de la stabilité des pigments

Les polyènes sont très sensibles à la température, à la lumière et à l'air ambiant (présence d'oxygène). On a donc procédé à une étude de thermolabilité du tout-trans rétinol et du tout-trans rétinol en utilisant la technique de chromatographie sur couche mince. Les chromophores ont été dissous dans l'éther diéthylique, toutes les concentrations sont de 1×10^{-3} M. Immédiatement après la préparation de la solution, 10 μ l de la solution est déposée sur la plaque chromatographique de gel de silice GF-254. L'effet du temps s'est fait suivant la procédure suivante: au temps, $t = 0$, nous avons déposé la plaque chromatographique dans la chambre de saturation en utilisant comme solvant de migration le mélange 3% acétone dans l'iso-octane. Au temps, $t = x$ min, la solution de polyène déposée sur la plaque chromatographique a été laissée x min sur la plaque à l'air libre avant que la plaque soit mise dans la chambre de saturation. Le solvant de migration permet de séparer les différents composés formés lors de ce temps d'exposition à l'air ambiant. Nous avons pris soin de travailler en lumière rouge de faible intensité, suite à la préparation de la plaque; elle a été mise en noirceur pour examiner l'effet du temps.

Le tableau 2a présente l'effet du temps sur la stabilité du tout-trans rétinol à 295 K.

Tableau 2. Thermolabilité du tout-trans rétinola. Stabilité à 295 K

<u>Tout-trans rétinol</u>	<u>Nombre de taches</u>	<u>Identification</u>
0 min	1	Trans rétinol
5 min	5	Trans-rétinol, trans-rétinal, 13-cis rétinol, X et Y
20 min	5	Trans-rétinol, trans-rétinal, 13-cis rétinol, X et Y
30 min	5	Trans-rétinol, trans-rétinal, 13 cis rétinol, X et Y
60 min	5	Trans-rétinol, trans-rétinal, 13-cis rétinol, X et Y

On observe une dégradation importante après seulement cinq minutes, donc le tout-trans rétinol est très instable. Dans les sous-produits formés, il y a une tache étendue comprenant le trans-rétinol et ses isomères tandis que les autres taches sont le tout-trans rétinol, le 13-cis rétinol et les composés X et Y que l'on n'a pas identifiés.

On a poursuivi l'effet du temps jusqu'à trois cent soixante minutes et le résultat est identique. Il y a augmentation de la concentration des sous-produits au détriment de la quantité de tout-trans rétinol initialement déposée.

Il est à noter que nous avons obtenu un résultat identique dans le cas de l'acétate de rétinol.

La dégradation produite par l'effet temps à une interface air/solide pour le rétinol peut être due à la température à laquelle est effectuée l'expérience (295 K), l'air ambiant (autooxydation) et la surface solide (gel de silice) ou un effet cumulatif de ces trois paramètres.

Nous avons examiné l'effet de température sur la stabilité de ce chromophore. Au lieu de faire l'expérience à 295 K, la température des plaques a été fixée à 277 K. Les résultats sont donnés dans le tableau 2b.

Tableau 2. Thermolabilité du tout-trans rétinolb. Stabilité à 277 K

<u>Tout-trans rétinol</u>	<u>Nombre de taches</u>	<u>Identification</u>
0 min	0	Trans rétinol
30 min	3	Trans rétinol, 13-cis rétinol et trans rétinol
60 min	3	Trans rétinol, 13-cis rétinol et trans rétinol
210 min	3	Trans rétinol, 13-cis rétinol et trans rétinol

On observe la présence des rétinols et du tout-trans rétinol, mais non la présence des composés X et Y. Il est à noter que pour un temps de 210 minutes, la dégradation est moins importante à 277 K que pour un temps de 60 minutes à 295 K. La température a un effet sur la dégradation mais ce n'est pas la seule composante, il y a aussi un effet de l'oxygène (air ambiant) et/ou de la surface.

Quant à l'étude de la stabilité du tout-trans rétinol, les résultats sont présentés au tableau 3.

Tableau 3. Effet du temps sur la stabilité du tout-trans rétinol à 295 K

<u>Tout-trans rétinol</u>	<u>Nombre de taches</u>	<u>Identification</u>
0 min	1	Trans rétinol
60 min	2	Trans rétinol, 13-cis rétinol
300 min	2	Trans rétinol, 13-cis rétinol
20 h	2	Trans rétinol, 13-cis rétinol
100 h	4	Trans rétinol, 13-cis rétinol, rétinols
12 jours	5	Trans rétinol, 13-cis rétinol, 9-cis rétinol, rétinols.

On observe deux facteurs importants dans ces résultats. Le tout-trans rétinol est beaucoup plus stable que le tout-trans rétinol dans des conditions identiques. Bien que la seule différence entre les deux molécules se situe au niveau des groupements terminaux, la dégradation est plus importante dans le cas du tout-trans rétinol.

L'effet du temps sur le trans-rétinal conduit à la formation de sous-produits facilement identifiables. En utilisant les valeurs de R_f et les positions des maxima que l'on trouve dans les spectres d'absorption des produits formés (voir tableau 4), il est possible de déterminer correctement les isomères de rétinol formés. Notre étude montre que l'isomère de rétinol le plus abondant est le 13-cis rétinol.

La technique expérimentale relative à l'obtention du spectre d'absorption d'une tache de la plaque chromatographique est donnée à la section 2.1.3.

Tableau 4. Identification des sous-produits du tout-trans rétinol

<u>Tout-trans rétinol (20 heures)</u>	<u>Nombre de taches</u>	<u>λ_{\max}</u>
Produit non élué, 20 heures sur la plaque	1	370
Tache 1 Tout-trans rétinol	1	370
Tache 2 13-cis rétinol	1	366
<u>Tout-trans rétinol (100 heures)</u>	<u>Nombre de taches</u>	<u>λ_{\max}</u>
Produit non élué, 100 heures sur la plaque	1	368
Tache 1 rétinals	2 ou 3	318-334
Tache 2 Tout-trans rétinol	1	369
Tache 3 13-cis rétinol	1	366

Si on regarde les taches qui ont été remises en solution et dont on a enregistré le spectre d'absorption, on voit que le spectre du mélange pour un effet de temps de 20 heures et de 100 heures n'est pas modifié. Par contre, lors de la séparation par chromatographie, on remarque pour 20 heures, la présence de 13-cis rétinol ($\lambda_{\text{max}} = 366 \text{ nm}$) et pour 100 heures, en plus du 13-cis, on note la présence des rétinols (318-334 nm).

On a aussi vérifié l'effet du temps sur les isomères de rétinals tels que le 9-cis, 11-cis et le 13-cis. Les isomères 9-cis et 11-cis sont moins stables que le tout-trans rétinol parce qu'ils ont tendance à se transformer rapidement en tout-trans rétinol. Le 13-cis se compare au tout-trans parce qu'il se forme un équilibre entre le 13-cis et le tout-trans.

3.1.3 Discussion

Le travail en chromatographie sur couche mince a démontré que les polyènes sont altérés lorsqu'ils sont déposés à l'interface air/solide pour différents intervalles de temps. Les composantes susceptibles d'affecter ces produits sont la température, la surface et l'air ambiant. L'étude en chromatographie a démontré que les rétinols sont plus sensibles aux changements en fonction du temps que les rétinals, la dégradation des rétinols est possiblement causée par leur groupement alcool seule caractéristique différente entre les deux produits. Par contre,

le rétinol subit des modifications mais à un degré moindre. On observe une stabilité beaucoup plus grande pour ce chromophore. En abaissant la température, on remarque une diminution de la dégradation des pigments.

L'ensemble de nos observations en chromatographie sur couche mince et en spectroscopie d'absorption permet d'établir une méthode expérimentale pour identifier les sous-produits des rétinals et des rétinoles.

3.2 11-Cis rétinol en solution

Le 11-cis rétinol est le chromophore de la rhodopsine, responsable de l'absorption de l'énergie électromagnétique lors du processus primaire de la vision. Les propriétés spectroscopiques de cette molécule ont été observées dans différents solvants.

3.2.1 Spectroscopie d'absorption

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre ultraviolet-visible Perkin Elmer Coleman 124. Toutes les solutions ont été préparées à une température de 295 K et en présence d'une lumière rouge. La figure 21 donne le spectre d'absorption du 11-cis rétinol dans le n-hexane. La concentration de la solution est de 8.44×10^{-5} M; les cellules utilisées ont un parcours optique de 0.2 cm.

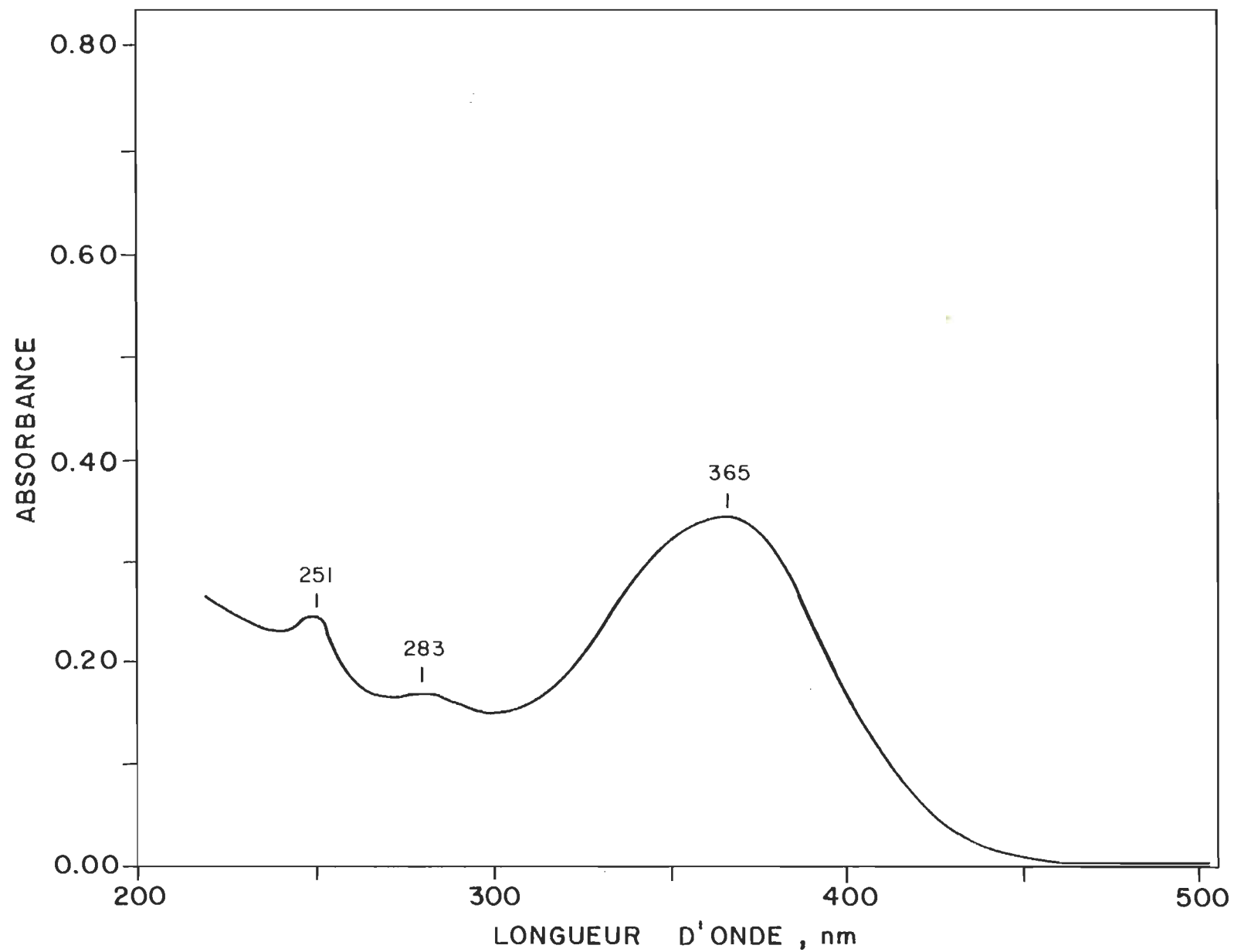


Figure 21. Spectre d'absorption du 11-cis rétinol dans le n-hexane

En se référant au spectre d'absorption, on obtient les caractéristiques suivantes :

Coefficient d'extinction molaire : $20\,740\text{ l mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$

Largeur de la bande à demi-hauteur : $6\,520\text{ cm}^{-1}$

$\lambda_{\text{max}} = 365$

Rapport des bandes d'absorption : $\frac{A_{365}}{A_{251}} = 1.46$

$$\frac{A_{365}}{A_{283}} = 2.12$$

$$\frac{A_{251}}{A_{283}} = 1.45$$

Quant au spectre d'absorption du 11-cis rétinol dans un solvant polaire tel que l'éther diéthylique, il est présenté à la figure 22 pour une concentration en chromophore de $2.70 \times 10^{-5}\text{ M}$; les cellules optiques ont un parcours de 1 cm.

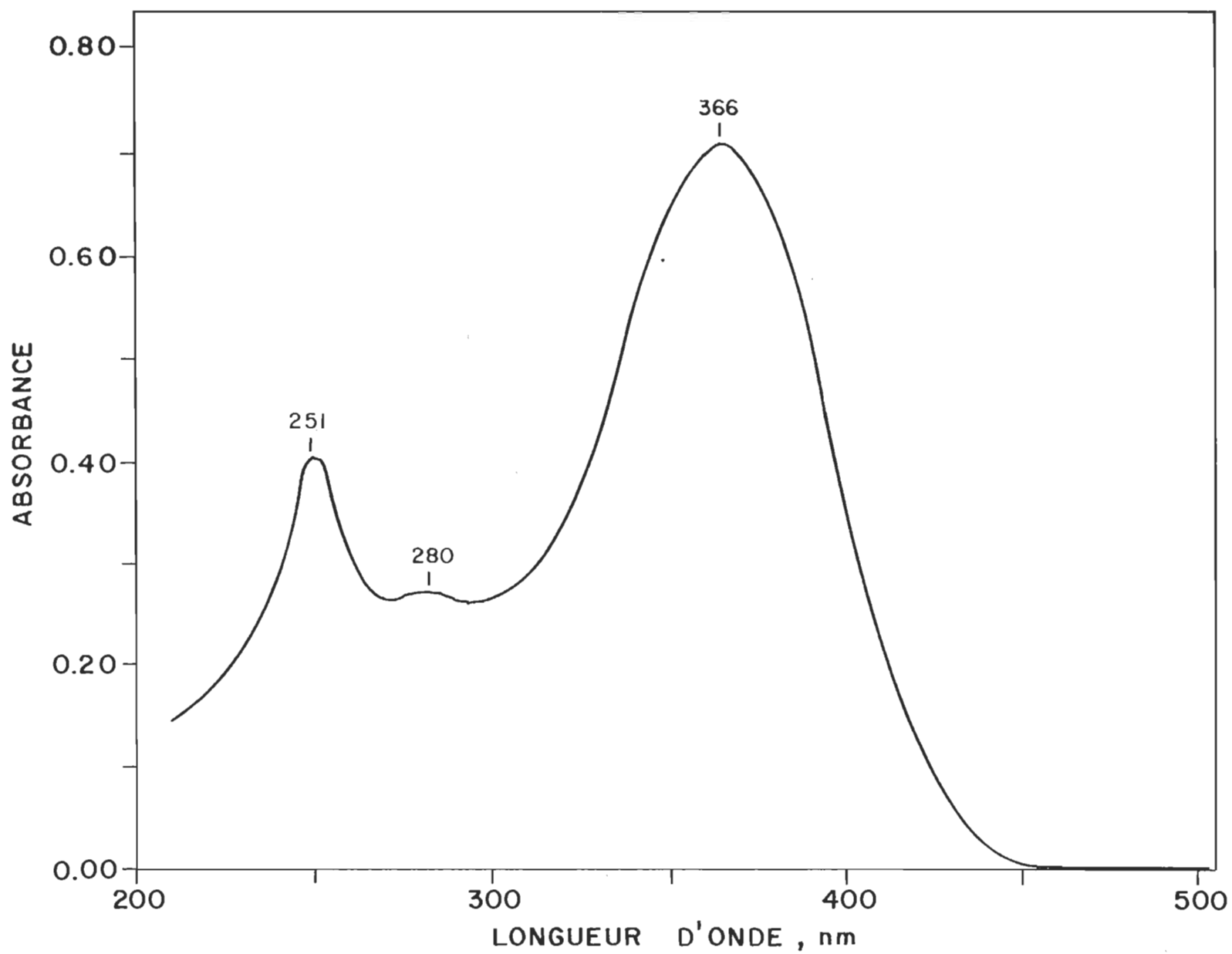


Figure 22. Spectre d'absorption du 11-cis rétinol dans l'éther diéthylique.

Les caractéristiques du spectre sont les suivantes :

Coefficient d'extinction molaire : $27\,350\text{ l mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$

Largeur de bande à demi-hauteur : $6\,360\text{ cm}^{-1}$

$\lambda_{\text{max}} = 366$

Rapport des bandes d'absorption : $\frac{A_{365}}{A_{250}} = 1.615$

$$\frac{A_{366}}{A_{280}} = 2.37$$

$$\frac{A_{250}}{A_{280}} = 1.47$$

Le spectre d'absorption du 11-cis rétinol dans l'EPA (éther diéthylique: pentane: alcool, 5:5:2) est représenté à la figure 23. La concentration du 11-cis est de $1.40 \times 10^{-4}\text{ M}$; le parcours optique des cellules est de 0.2 cm.

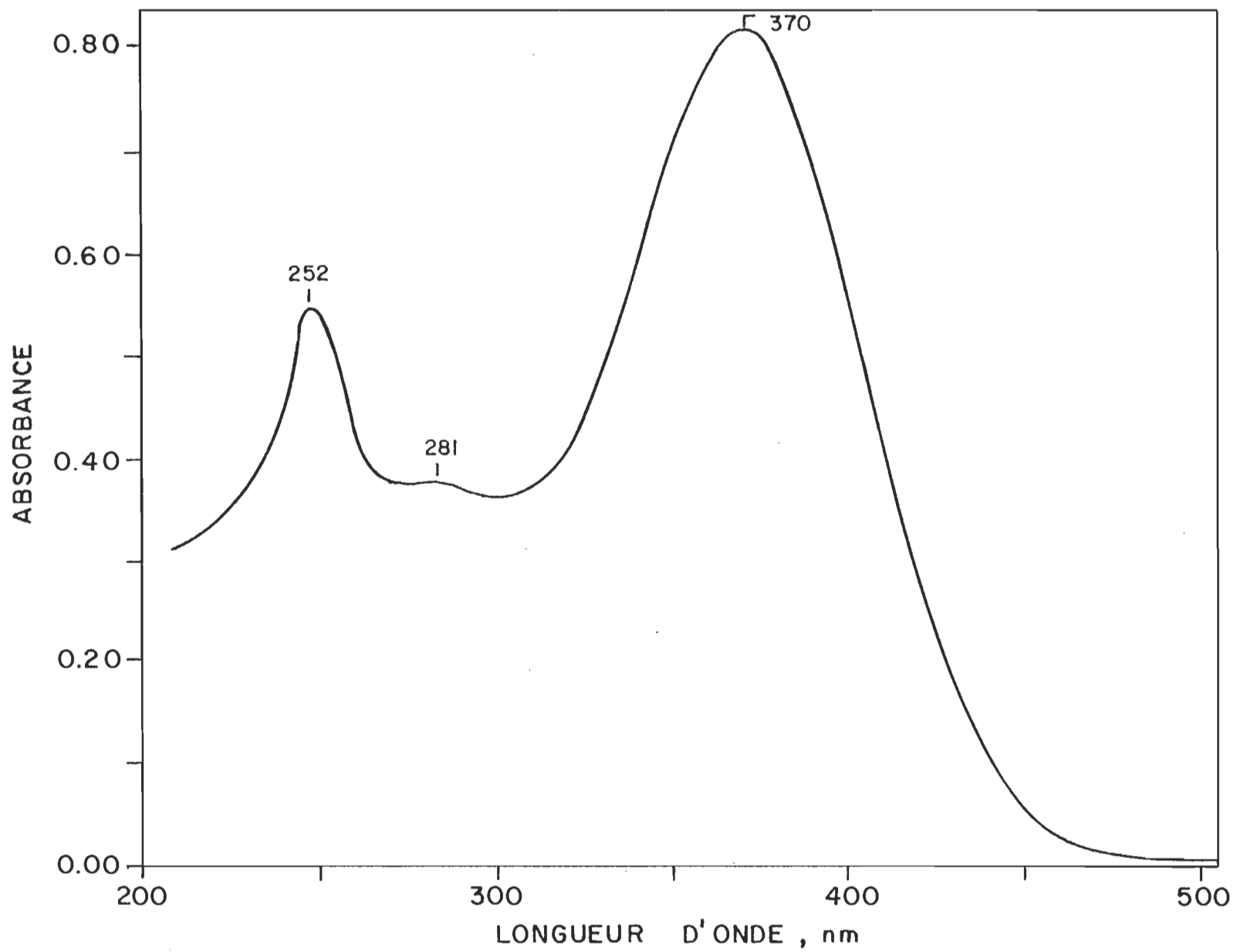


Figure 23. Spectre d'absorption du 11-cis rétinol dans EPA

Les caractéristiques spectrales sont les suivantes :

Coefficient d'extinction molaire : $27\,830 \text{ l mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Largeur de bande à demi-hauteur : $6\,900 \text{ cm}^{-1}$

$\lambda_{\text{max}} = 370$

Rapport des bandes d'absorption : $\frac{A_{370}}{A_{252}} = 1.52$

$$\frac{A_{370}}{A_{281}} = 2.20$$

$$\frac{A_{252}}{A_{281}} = 1.44$$

3.2.2 Discussion

L'étude en solution du 11-cis rétinol apporte les informations suivantes. On note un déplacement vers le rouge du pic d'absorption maximum lorsque l'on augmente la polarité du solvant. Théoriquement, ce phénomène s'explique par la présence de transitions $\pi \longrightarrow \pi^*$ chez ce genre de molécules. Le 11-cis rétinol contient une chaîne de doubles liaisons conjuguées qui sont responsables de ce type de transition, par contre, la transition de type $n \longrightarrow \pi^*$ du groupement terminal aldéhyde n'apparaît pas dans le spectre d'absorption, probablement due à sa faible intensité en rapport avec la transition $\pi \longrightarrow \pi^*$. Dans les résultats, on note un déplacement vers le rouge des bandes principales lorsqu'on passe d'un solvant non-polaire à un solvant polaire. Le coefficient d'extinction molaire a lui aussi tendance à augmenter avec la polarité du solvant.

La spectroscopie d'absorption des polyènes linéaires est un domaine qui a été étudié depuis longtemps. Les spectres du 11-cis rétinol obtenu dans notre travail sont en accord avec les travaux déjà réalisés sur ce type de molécules (Staff of Biological lab., 1959; Speeling, 1973). Nous utiliserons ces résultats comme standard de départ, face à une étude plus élaborée en film solide et en monocouche.

3.3 11-Cis rétinol en film solide

Nous avons utilisé les films solides pour deux raisons majeures. Le film solide est un système intermédiaire entre la solution à température ambiante où les molécules ont beaucoup de liberté dans le solvant et la solution à basse température, 77 K, où les molécules n'ont pratiquement pas de mobilités, système rigide. La deuxième caractéristique d'un système comme le film solide est celui de l'état désorganisé des molécules par rapport à l'état monomoléculaire. C'est l'étape précédant l'utilisation de la technique des monocouches.

3.3.1 Spectroscopie d'absorption

Pour enregistrer les spectres des films solides dans le spectrophotomètre Coleman 124, on a utilisé le porte lamelles décrit dans la section 2.5.1.

3.3.1.1 Spectre en solution comparé à celui du film solide

Le spectre du 11-cis rétinol en solution dans l'éther diéthylique est comparé à ceux de deux films solides qui ont été préparés sur lamelle de quartz. La figure 24 présente les spectres tandis que le tableau 5 donne les caractéristiques de la préparation des films solides.

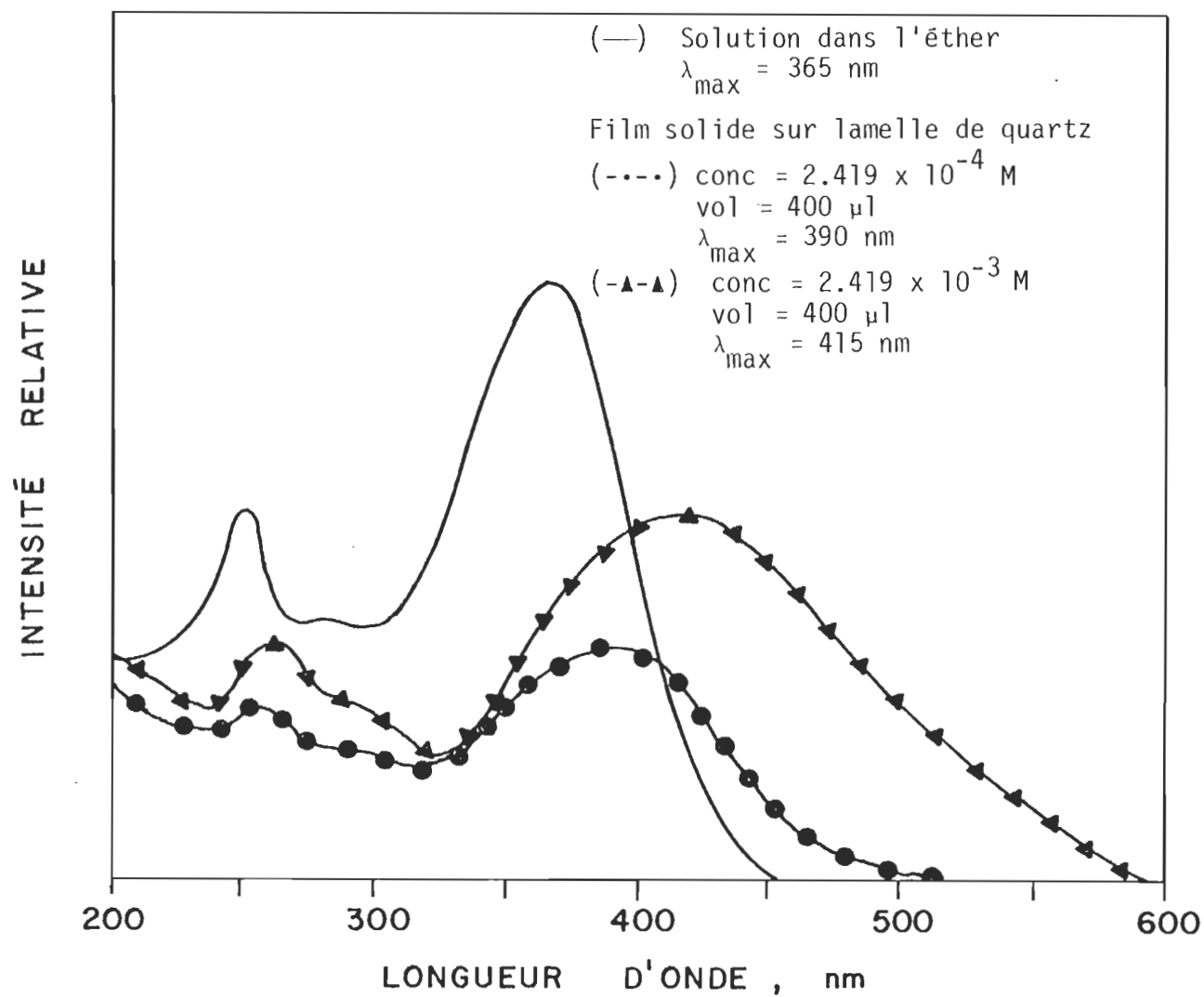


Figure 24. Spectres d'absorption du 11-cis rétinol en solution et en film solide.

TABLEAU 5

Position des maxima dans le spectre d'absorption
du 11-cis rétinol en film solide

<u>Concentration</u>	<u>Volume</u>	<u>Surface des lamelles</u>	<u>Molécules par unité de surface</u>	<u>λ_{\max}</u>
0.242 mM	0.4 cm ³	2.1 cm ²	2.7×10^{16}	390 nm
2.149 mM	0.4 cm ³	21 cm ²	27×10^{15}	415 nm

Dans le cas des films solides, on note un élargissement des bandes comparé à celles obtenues en solution. On note aussi un déplacement important λ_{\max} vers le rouge, soit de 50 nm. Ce déplacement est en rapport avec la concentration du film, voir tableau 5.

Les phénomènes qui contribuent à ce déplacement vers le rouge se résument ainsi, (i) un effet de surface produit par l'adsorption des molécules sur la surface de quartz; (ii) une interaction des molécules entre elles, c'est-à-dire une interaction chromophore-chromophore. Cette interaction est d'autant plus importante que l'on observe une augmentation du déplacement vers le rouge en augmentant le nombre de molécules par unité de surface.

3.3.1.2 Effet du temps sur le film solide à température ambiante

Comme pour la chromatographie sur couche mince, une étude de la stabilité du 11-cis rétinol en fonction du temps à l'interface air/quartz

a été faite. Nous avons déposé sur une lamelle de quartz 0.4 ml d'une solution 2.419 mM dans l'éther diéthylique. Les lamelles ont été déposées dans un dessiccateur que l'on a préalablement saturé avec un jet d'azote. Pour la mesure des spectres d'absorption, on a dissous les films dans l'éther diéthylique pour mesurer son spectre d'absorption.

A la figure 25, on remarque les spectres pour les différents intervalles de temps pris entre 0 et 24 heures. Les résultats montrent que pour des temps supérieurs à 10 heures, il y a une dégradation importante que l'on peut remarquer par un abaissement important de la bande à 390 nm de même que par un déplacement vers le bleu. Quant aux bandes d'absorption situées entre 300 et 200 nm, leurs absorbances ont tendance à augmenter.

Pour les spectres relatifs aux temps 0, 2, et 5 heures, les rapports des bandes sont identiques pour ces trois spectres.

$$\frac{A_{365}}{A_{250}} = 1.68 \quad \frac{A_{365}}{A_{280}} = 2.36 \quad \frac{A_{251}}{A_{284}} = 1.4$$

Cependant, on observe par TLC, la présence d'une faible quantité de tout-trans rétinol. Pour un temps supérieur à 5 h, la dégradation devient plus importante et d'autres sous-produits apparaissent. Dans l'ensemble, on note une très bonne stabilité du 11-cis rétinol en film solide. Ces résultats

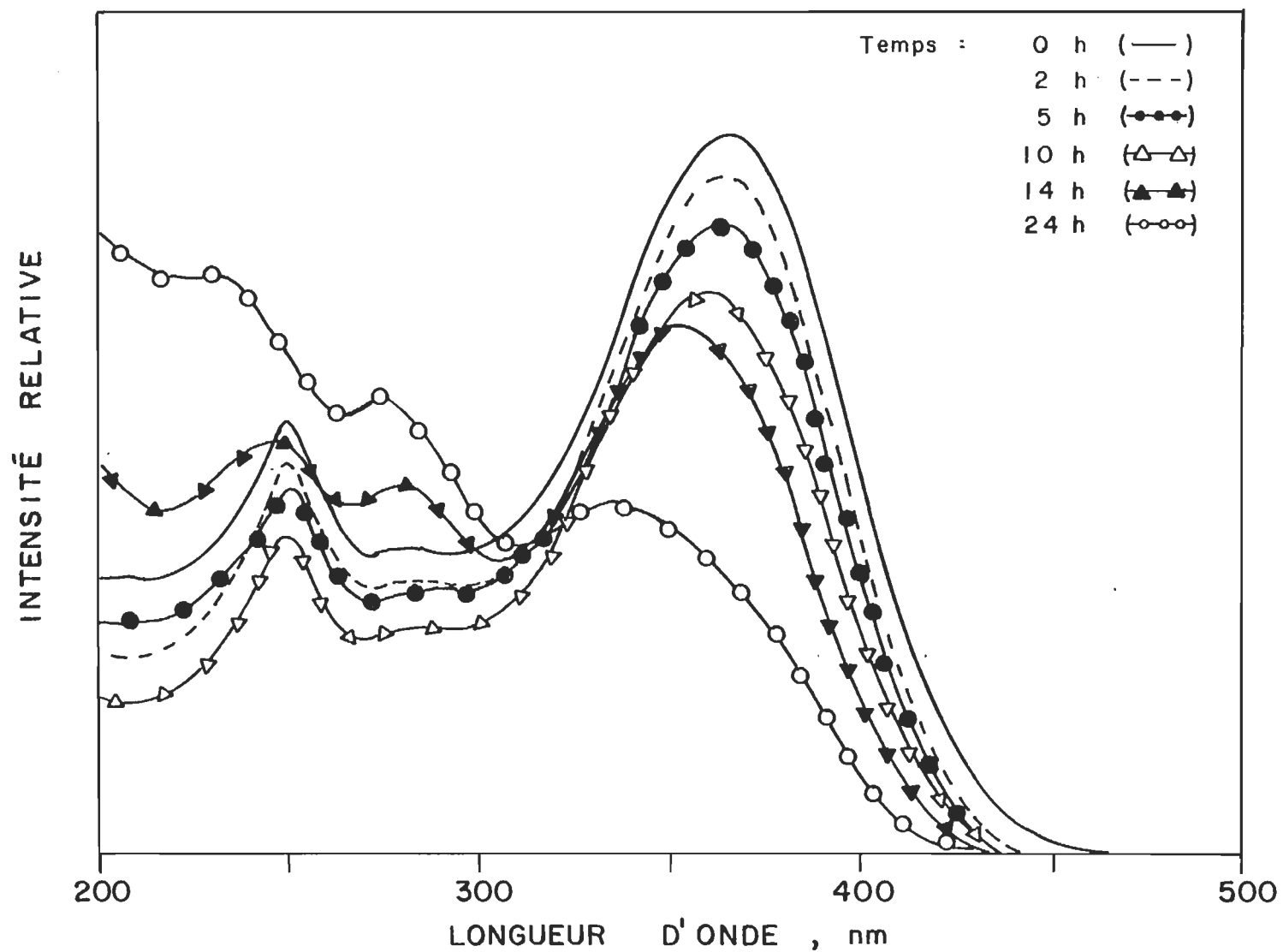


Figure 25. Spectres d'absorption de solution de 11-cis rétinol dans l'éther diéthylique obtenus à partir de films solides qui ont été laissés à la noirceur

nous permettent de croire que le 11-cis rétinol sera une molécule intéressante à étudier en monocouche puisque l'on observe une bonne stabilité de ce chromophore à température ambiante (Hotchandani et coll., 1977; Paquin et coll., 1977).

3.3.2 Discussion

Les résultats expérimentaux montrent que le 11-cis rétinol peut être considéré comme stable en film solide à température ambiante. Tel que suggéré par le professeur Wald et je cite "j'ai supposé que sa stabilité une fois formée est piégée entre des barrières énergétiques très élevées, d'origine cinétiques. On a besoin d'une énergie d'activation considérable pour former et déformer cet isomère, le 11-cis rétinol, ce qui est facilement effectué par l'énergie lumineuse, mais difficile à modifier en absence de lumière".

Les spectres du 11-cis rétinol démontrent que ce composé à l'état de film solide déplace ses bandes d'absorption vers le rouge. Ce déplacement est fonction du nombre de molécules par unité de surface. Il est expliqué par une interaction chromophore-chromophore entre les molécules du 11-cis rétinol. Mais, l'effet du temps sur ces films solides démontrent une dégradation de ces films c'est pourquoi un déplacement vers le bleu est observé. Nous croyons que la présence de trace d'oxygène soit responsable de la dégradation du film.

3.4 11-Cis rétinol en monocouche

Après avoir déterminé les propriétés spectroscopiques en solution et en film solide du 11-cis rétinol, nous passons à l'état monomoléculaire, système qui se rapproche des membranes biologiques naturelles.

3.4.1 Détermination de l'isotherme de pression de surface

A la partie Matériel et méthodes expérimentales, section 2, nous avons décrit les constituants d'un bain de monocouche ainsi que leurs caractéristiques. Maintenant, nous décrivons les étapes nécessaires au bon fonctionnement du système, en l'occurrence, l'étalonnage, la standardisation et l'étalement.

3.4.1.1 Etalonnage

Le travail en monocouche demande une qualité bien spéciale, soit un souci d'extrême propreté. Avant de débiter le travail, il faut bien s'assurer que tous les accessoires soient très bien nettoyés.

L'étalonnage du système s'effectue en deux étapes. Premièrement, on se doit de choisir un fil de torsion d'un diamètre qui nous permettra de travailler dans une région de pression souhaitable. Le diamètre du fil de torsion est relié directement à la pression que l'on doit appliquer au système pour effectuer une torsion sur le fil.

En deuxième lieu, il s'agit à l'aide d'une série de poids de déterminer la sensibilité du système. On utilise la pente du graphique des poids appliqués, P , au fil de torsion en fonction de la déviation en degré, θ , du fil de torsion (voir section 2.3.4). Lorsque le système fonctionne adéquatement, on obtient une relation linéaire dont la pente correspond à (P/θ) . Cette valeur est reportée dans l'expression suivante,

$$S = \frac{P}{\theta} \cdot \frac{g \cdot L_c}{L_f \cdot L}$$

Les valeurs des paramètres dans nos expériences sont les suivantes:

$$P/\theta = 0.0035 \text{ g degré}^{-1}$$

$$g = 980 \times 10^{-2} \text{ mN g}^{-1}$$

$$L_c = 8.75 \text{ cm}$$

$$L_f = 7.50 \text{ cm}$$

$$L = 13.70 \text{ cm}$$

La sensibilité de notre appareillage est de $S = 0.29 \text{ mN m}^{-1} \text{ degré}^{-1}$

En fonction du diamètre du fil de torsion, on peut obtenir la sensibilité désirée pour le type d'expérience planifiée. En sachant que les composés utilisés dans cette étude ont un collapse entre 15 et 20 mN m^{-1} , on a travaillé avec un système permettant d'obtenir des mesures de pression de surface situées entre 0 et 30 mN m^{-1} .

3.4.1.2 Standardisation

Maintenant que nous connaissons la sensibilité de notre système, il s'agit de le standardiser. On vérifie la pureté du solvant en déposant 100 μ l de ~~l'ether~~ diéthylique à l'interface air/eau. On avance la barrière mobile jusqu'à 3 ou 4 cm du flotteur, si le flotteur reste immobile, il indique que le solvant est de bonne qualité, sinon un déplacement du flotteur laisse supposer des impuretés dans le solvant. Dans ce cas, on doit le distiller jusqu'à ce que l'on élimine les produits tensio-actifs.

Nous avons pris l'isotherme de pression de surface de l'acide arachidique. Ce composé est un standard très employé pour l'étude en monocouche. Une solution d'acide arachidique (1.1×10^{-3} M) a été déposée sur une sous-phase de $\text{CdCl}_2, 10^{-3}$ M. L'isotherme de pression de surface du standard est identique à celle obtenue par Munger, G. (1978).

3.4.1.3 L'isotherme de pression de surface

Afin de vérifier notre technique de formation d'une monocouche liquide à l'interface air/eau, nous avons utilisé une solution de tout-trans rétinol dans l'~~ether~~ diéthylique comme référence. Nous avons comparé nos résultats à ceux de Hotchandani et coll. (1975). Ensuite, nous avons déterminé l'isotherme de pression de surface du 11-cis rétinol à l'interface air/eau.

L'isotherme du tout-trans rétinol

L'isotherme de pression de surface est déterminée en prenant la moyenne de huit courbes obtenues dans les mêmes conditions expérimentales. Voici les conditions expérimentales pour le tout-trans rétinol,

Solution	: 1.05×10^{-3} M dans éther diéthylique
Sous-phase	: Tampon phosphate, 0.1M, pH = 8.0
Température	: $21-22^{\circ}\text{C}$
Déposition	: 55 μl
Sensibilité du système	: $0.29 \text{ mN m}^{-1} \text{ degré}^{-1}$
Vitesse de compression	: 1 cm min^{-1}

Voyons un exemple de calcul de la courbe de pression de surface du tout-trans rétinol.

Lorsque la barrière est située à 15 cm du flotteur, on a une déviation de 7.8° sur le fil de torsion.

$$\begin{aligned}
 \text{Pression, } \Pi &= S \times \theta \\
 \Pi &= 0.29 \text{ mN m}^{-1} \text{ degré}^{-1} \times 7.8^{\circ} \\
 \Pi &= 2.26 \text{ mN m}^{-1}
 \end{aligned}$$

Aire moléculaire, A = Surface du bain/Nombre de molécules

$$A = 15 \text{ cm} \times 14.7 \text{ cm} / 3.499 \times 10^{16} \text{ molécules}$$

$$A = 15 \times 14.7 \times 10^{16} \text{ Å}^2 / 3.499 \times 10^{16} \text{ molécules}$$

$$A = 63.02 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$$

Donc à $\pi = 2.26 \text{ mN m}^{-1}$ l'aire moléculaire est de

$$A = 63.02 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}.$$

L'isotherme de pression de surface pour le tout-trans rétinol est présentée à la figure 26.

On note que la courbe obtenue pour le tout-trans rétinol concorde bien avec celle de référence (Hotchandani et coll., 1975). L'aire moléculaire limite se situe à $59 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$.

L'isotherme du 11-cis rétinol

Le 11-cis rétinol est un produit qui n'est pas accessible commercialement dû à la difficulté d'extraction et de purification de ce produit. C'est pourquoi je tiens à remercier la compagnie Hoffman La Roche pour nous avoir fourni gratuitement cet échantillon. On sait que le 11-cis rétinol est un composé très sensible à la lumière, la chaleur et la température, nous avons donc été très minutieux dans la préparation des solutions.

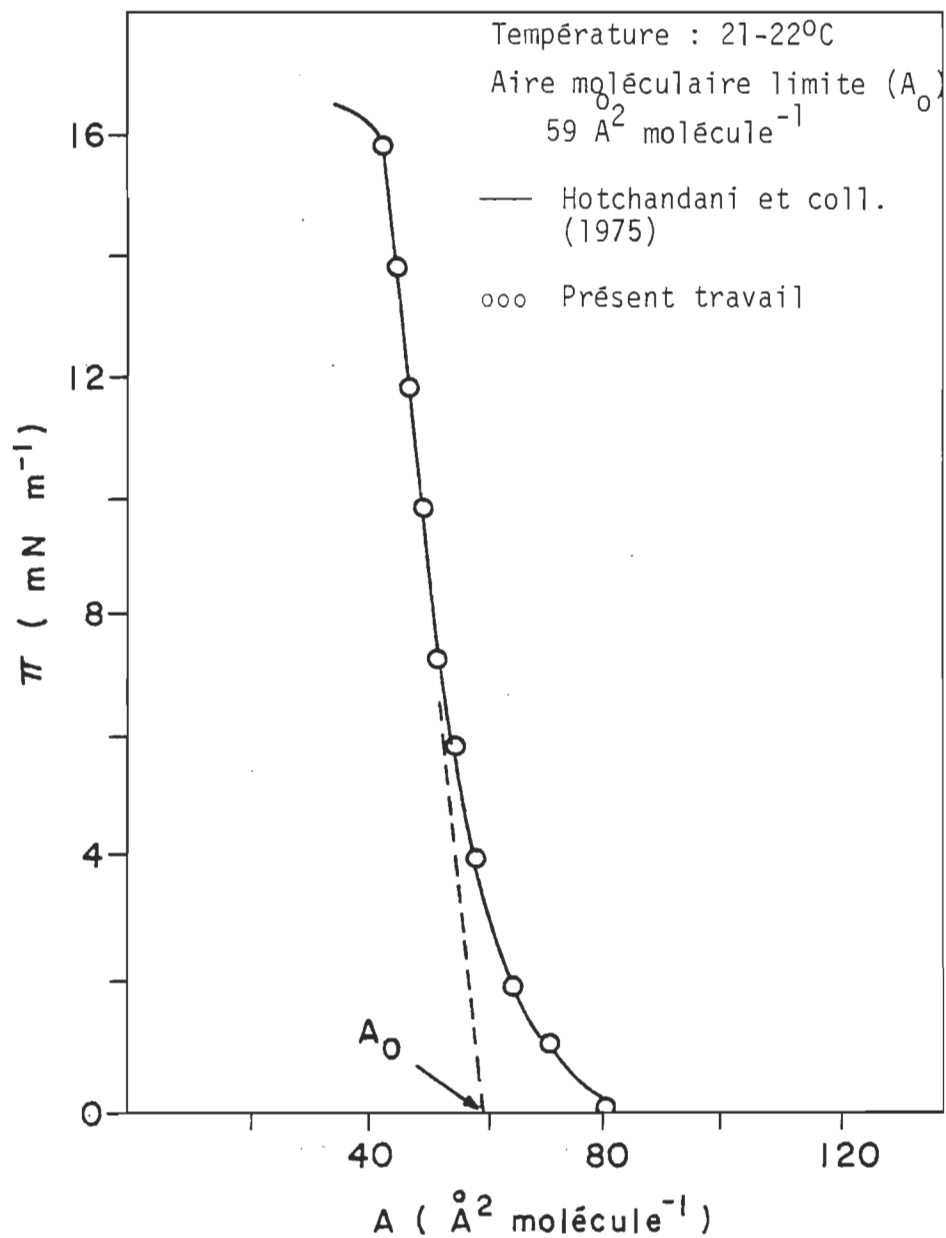


Figure 26. Isotherme de pression de surface du tout-trans rétinol (sous-phase: tampon phosphate, pH = 8.0).

Les conditions expérimentales pour le 11-cis rétinol sont les suivantes:

Solution	: 8.4×10^{-4} M dans éther diéthylique
Sous-phase	: Tampon phosphate, 0.1 M, pH = 8.0
Sensibilité du système	: $0.29 \text{ mN m}^{-1} \text{ degré}^{-1}$
Vitesse de compression	: 1 cm min^{-1}

Les premiers essais faits avec un échantillon de 11-cis rétinol nous ont donné une courbe avec un collapse à 14 mN m^{-1} . On note que le changement d'aire moléculaire est assez lent à faible pression. L'aire moléculaire limite, A_0 , se situe à $77 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$, on peut voir l'aspect de cette courbe à la figure 27.

A la figure 28, on a un schéma de la position du 11-cis rétinol à l'interface air/eau, position déterminée à l'aide d'un modèle CPK. Le schéma nous montre que la tête polaire du 11-cis rétinol est en contact avec l'eau tandis que la partie apolaire est située à l'extérieure. La molécule est pratiquement perpendiculaire à la surface de l'eau. Quant à sa chaîne de doubles liaisons, elle s'élève vers le haut avec la présence du cycle β -ionone au sommet ce qui augmente l'aire moléculaire.

Par la suite, nous avons reçu d'autres échantillons de la compagnie Hoffman La Roche. La majorité des échantillons présentent des isothermes similaires à celle de la figure 29, l'isotherme a une aire moléculaire

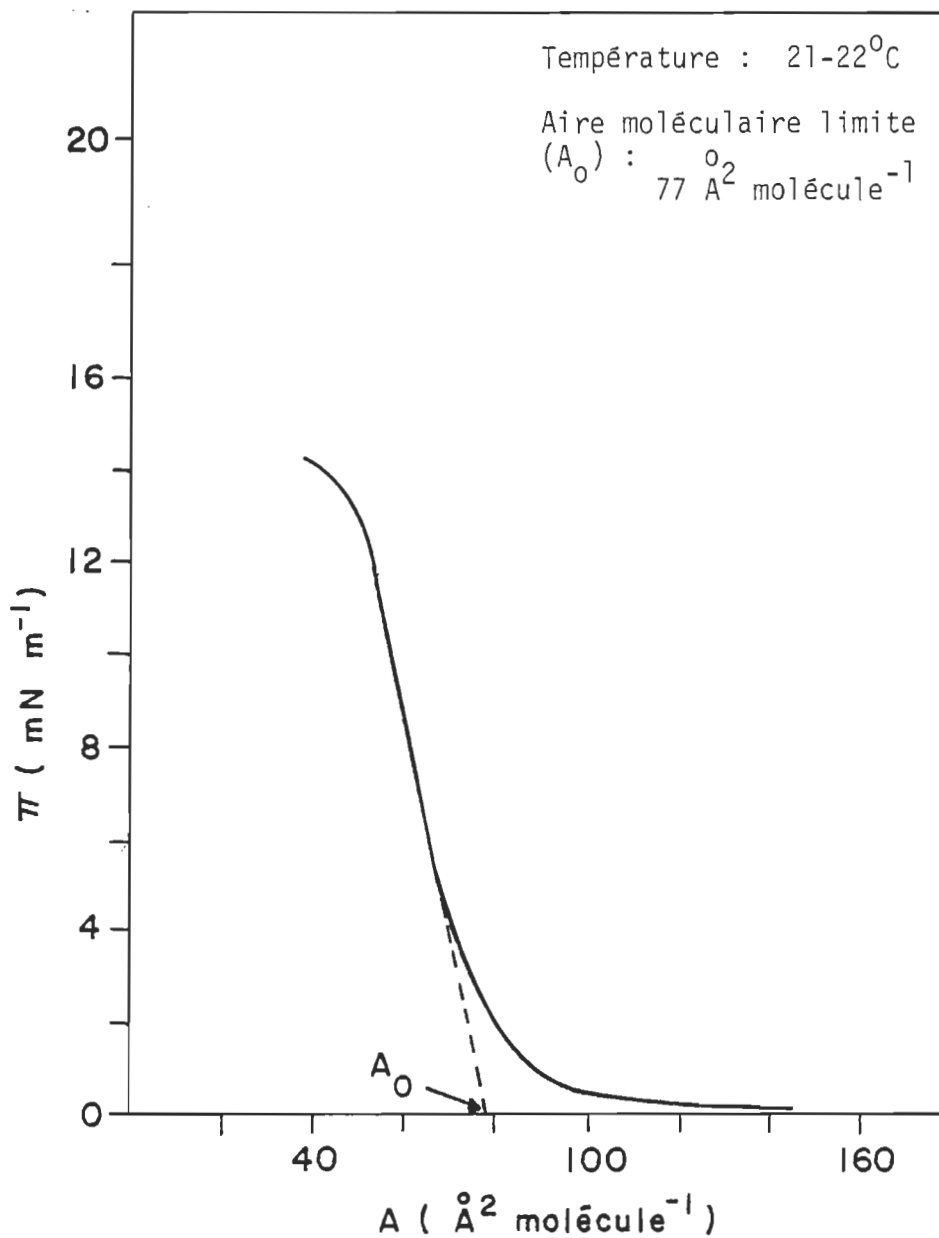


Figure 27. Isotherme de pression de surface du 11-cis rétinol (sous-phase: tampon phosphate, pH = 8.0).

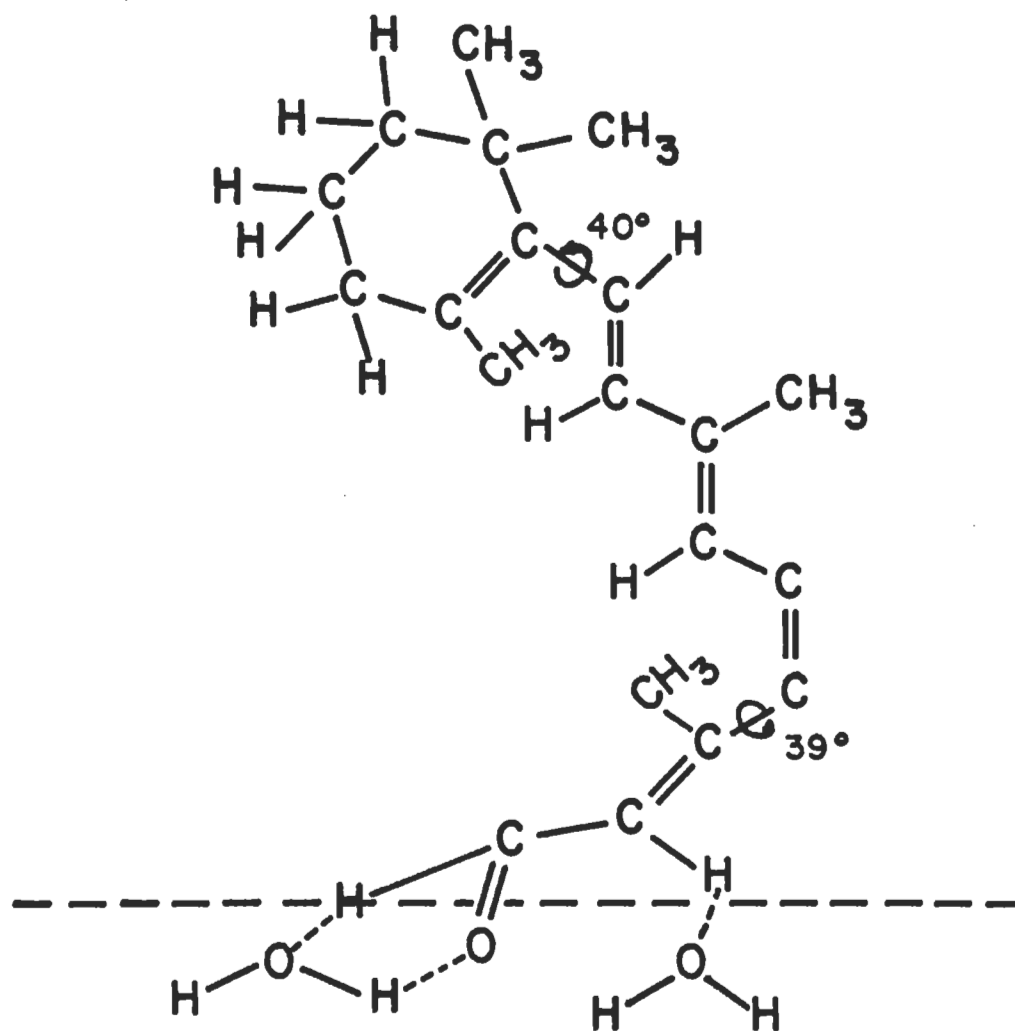


Figure 28. Orientation moléculaire du 11-cis rétinol à l'interface air/eau.

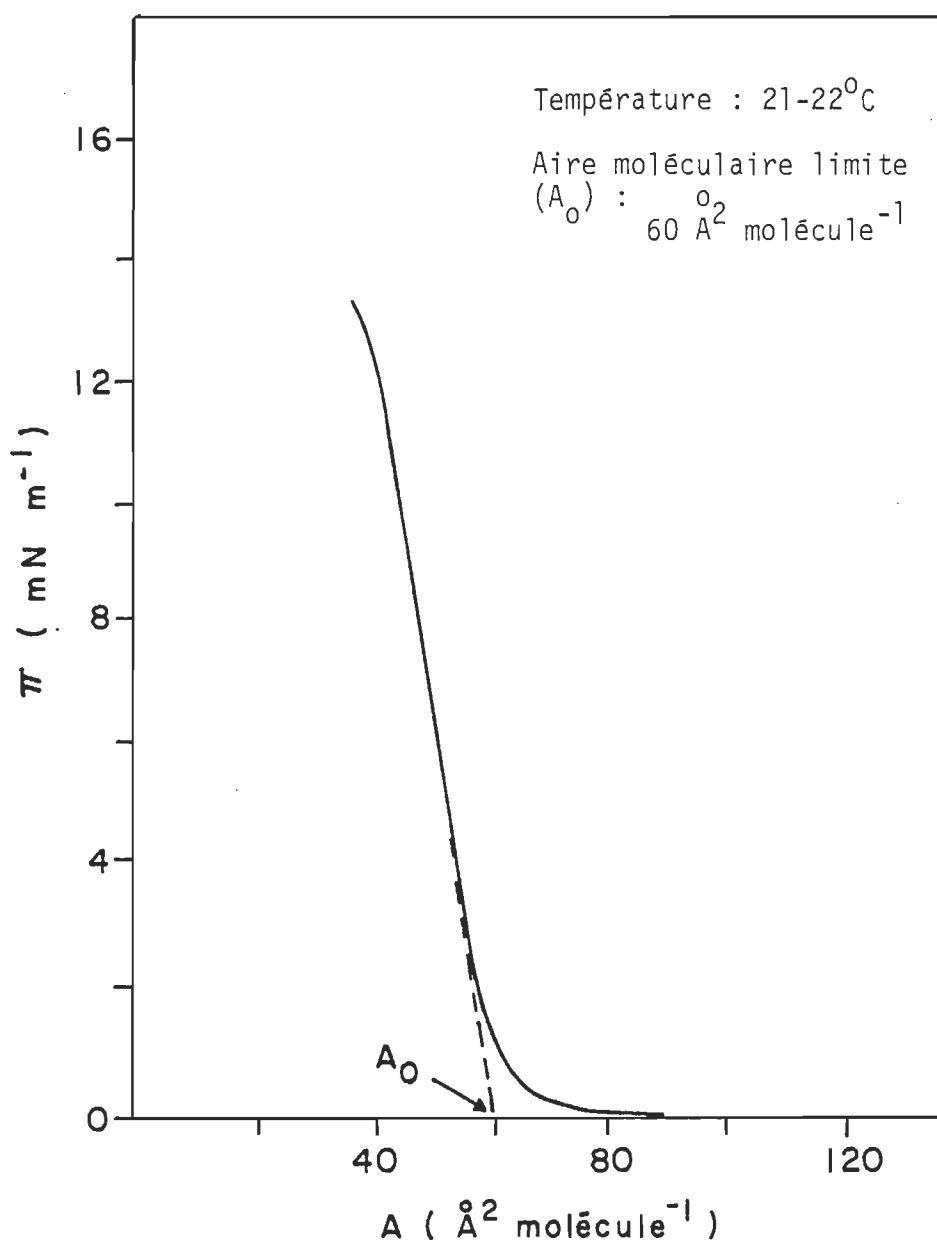


Figure 29. Isotherme de pression de surface du 11-cis rétinol
 (sous-phase: tampon tris-HCl, pH =7.2)

limite située à $60 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$ et on remarque également une montée plus abrupte de la courbe.

Maintenant, comparons nos résultats en monocouche à ceux du groupe du Professeur Brody. Il est important de noter qu'aucun résultat n'est donné sous forme d'aire moléculaire limite, A_0 . Il compare ses résultats en utilisant une valeur choisie directement sur la courbe, cette valeur se situe juste avant la région du collapse. Pour une pression de surface de 10 mN m^{-1} , $A_{10} = 48 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$ en utilisant comme sous-phase, L-lysine, 10^{-5} M , $\text{pH} = 6.0$, mais cette valeur se rapproche très près de notre courbe $A_{10} = 46 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$ bien que notre sous-phase soit différente. (Brockman et Brody, 1971; Brody, 1973; Yckowski et Brody, 1974; Puppala et Brody, 1975, Karan et Brody, 1975). Cependant, le groupe de Brody a observé des changements importants de A_{10} lorsque l'on remplaçait la sous-phase ce que notre étude n'a pas démontré.

3.4.2 Dépôt sur un support solide

Le transfert d'une monocouche à l'interface air/eau à un support solide, donc à l'interface air/solide est une technique très délicate. Il faut procéder avec attention pour ne pas détruire l'arrangement monomoléculaire du produit. Tout d'abord, on doit déterminer à quelle pression de surface la déposition s'effectuera, cette valeur est spécifique à chaque type de molécules. Normalement, on utilise une pression près de la région du collapse, c'est-à-dire à l'endroit où l'aire moléculaire est très près de l'aire moléculaire limite A_0 .

La déposition sur un support solide s'effectue comme décrit précédemment (voir section 2.4, page 44). Il est bien important de compresser la barrière mobile pour pallier à la perte de molécules tout en gardant la même pression de déposition.

Le rapport de déposition pour une monocouche doit se situer entre 0.9 et 1.1. La définition du rapport de déposition est donnée à la section 2.4.3 (page 45).

Dans le cas du 11-cis rétinol, la pression de déposition est de 11 mN m^{-1} . Pour déposer le 11-cis, nous avons utilisé des surfaces hydrophiles et hydrophobes. La surface hydrophile est une lamelle de quartz et les molécules de 11-cis rétinol lorsque déposées à cette interface s'accrochent d'après la déposition en Z (voir figure 15). Dans ce cas, pour déposer une monocouche, on plongeait la lamelle dans la sous-phase avant la formation de la monocouche, ensuite on formait la monocouche puis on retirait la lamelle de la sous-phase. Nous avons ainsi une monocouche à l'interface air/solide. Nous avons tenté de déposer plus d'une couche sur cette surface mais sans succès.

Par la suite, on a utilisé une surface hydrophobe pour déposer le 11-cis rétinol. Dans le but d'obtenir une bonne déposition, on a d'abord déposé cinq monocouches d'arachidate de cadmium sur les lamelles de quartz pour les rendre hydrophobes. Ensuite, on y attachait le 11-cis rétinol. Avec ce système, les monocouches d'arachidate de cadmium s'attachent d'après la déposition Y tandis que la déposition du 11-cis est du type X.

Dans les tableaux et les figures suivantes, nous répartissons les résultats obtenus en spectroscopie avec les dépôts sur support solide que nous avons préparés.

3.4.3 Spectroscopie d'absorption en monocouche

Au tableau 6, on note les absorbances à λ_{\max} pour chacune des lamelles ayant sur chaque face une monocouche de 11-cis rétinol. De plus, les absorbances à λ_{\max} pour une série de lamelles sont aussi présentées. Les monocouches ont été déposées sur des lamelles hydrophiles en quartz. La température de mesure des spectres d'absorption est à 295 K. Le $\Delta\lambda_{\max}$ exprime la relation λ_{\max} en monocouche moins λ_{\max} en solution pour la bande principale dans le visible. Les derniers résultats de ce tableau donnent l'effet du temps. La figure 30 représente cet effet.

TABLEAU 6

Propriétés spectroscopiques du 11-cis rétinol en monocouche à 295 K

<u>Lamelles</u>	<u>Rapport de déposition</u>	<u>Absorbance</u>	<u>$\nu_{\frac{1}{2}}$ (cm^{-1})</u>	<u>λ_{\max} (nm)</u>	<u>$\Delta\lambda_{\max}$ (nm)</u>
# 1	1.12	0.0115	6,607	379	+ 13
# 2	0.81	0.0100	8,050	378	+ 12
# 3	0.90	0.0175	8,436	379	+ 13

<u>Lamelles</u>	<u>Rapport de déposition</u>	<u>Absorbance</u>	<u>$\nu_{\frac{1}{2}}$ (cm^{-1})</u>	<u>λ_{max} (nm)</u>	<u>$\Delta\lambda_{\text{max}}$ (nm)</u>
# 4	0.90	0.0085	6,494	377	+ 12
# 5	0.80	0.0070	8,050	380	+ 14
{ # 1 # 2		0.0225	8,350	380	+ 14
{ # 1 # 2 # 3		0.036	8,355	380	+ 14
{ # 1 # 2 # 3	3 heures température 295 K	0.036	8,355	380	+ 14
{ # 1 # 2 # 3 # 4		0.045	8,355	378	+ 12
{ # 1 # 2 # 3 # 4 # 5		0.053	8,355	378	+ 12

<u>Lamelles</u>		<u>Absorbance</u>	$\nu_{\frac{1}{2}}$ (cm ⁻¹)	λ_{max} (nm)	$\Delta\lambda_{\text{max}}$ (nm)
{ # 1 # 2 # 3 # 4 # 5	3 heures température 295 K	0.042	8,355	378	+ 12
{ # 1 # 2 # 3 # 4 # 5	24 heures température 295 K	0.034	7,327	370	+ 4
{ # 1 # 2 # 3 # 4 # 5	48 heures température 295 K	0.026	7,037	365	- 1

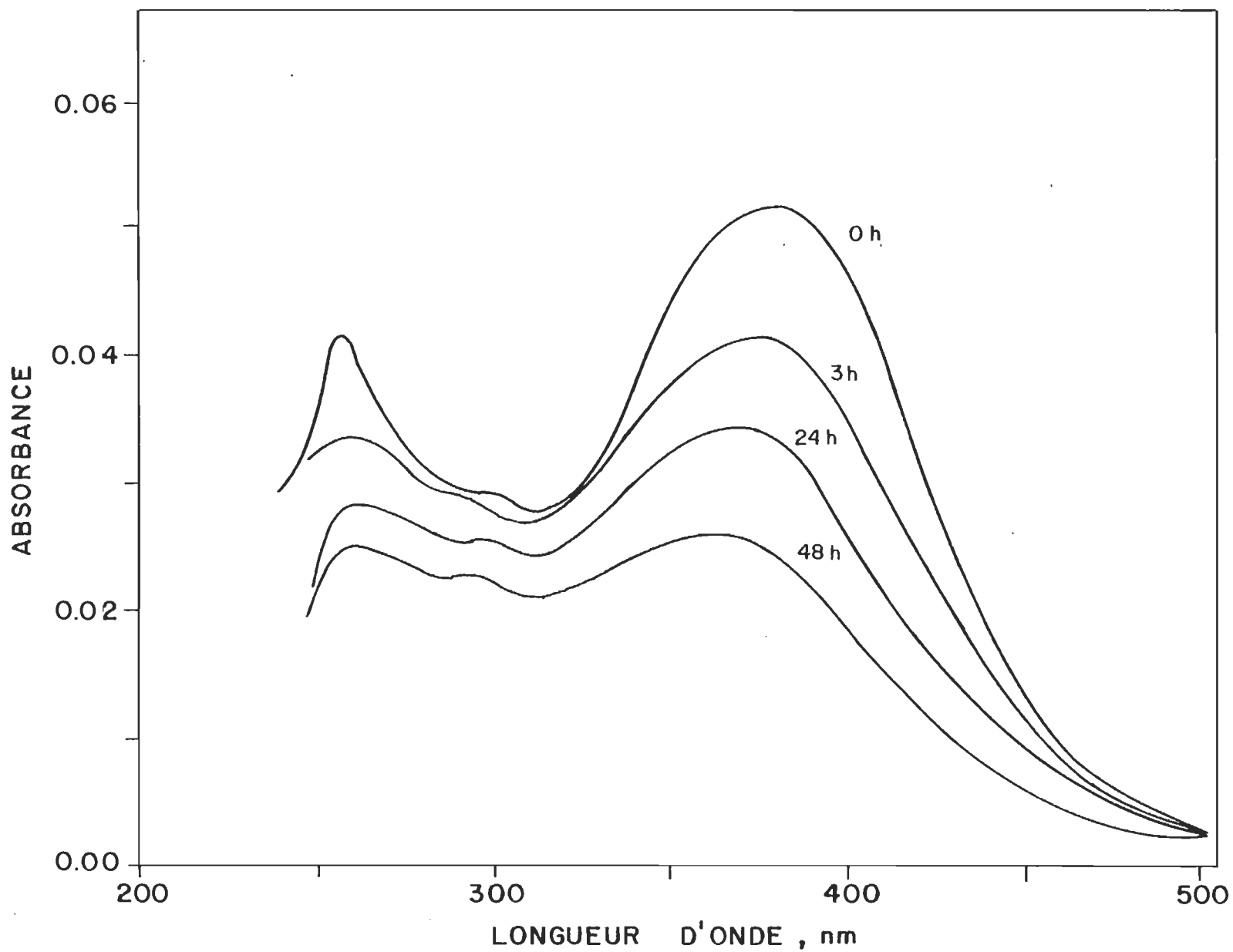


Figure 30. Spectres d'absorption du 11-cis rétinale en monocouche (intervalles de temps: 0, 3, 24, 48 heures à 295 K)

Le tableau 7 est de même nature que le tableau précédent mais l'effet du temps a été fait à 283 K. La figure 31 présente l'effet du temps à 283 K pour la série de 4 lamelles ayant sur chaque face une monocouche de 11-cis rétinol.

TABLEAU 7

Propriétés spectroscopiques du 11-cis rétinol en monocouche à 283 K.

<u>Lamelles</u>	<u>Rapport de déposition</u>	<u>Absorbance</u>	$\nu_{\frac{1}{2}}$ (cm^{-1})	$\frac{\lambda_{\text{max}}}{(\text{nm})}$	$\frac{\Delta\lambda_{\text{max}}}{(\text{nm})}$
# 1	-	0.015		377	+ 12
# 2	1.09	0.012		377	+ 12
# 3	1.02	0.014		377	+ 12
# 4	1.17	0.018		377	+ 12
{ # 1 # 2		0.027	7,052	377	+ 12
{ # 1 # 2 # 3		0.041	6,997	377	+ 12
{ # 1 # 2 # 3 # 4		0.059	7,905	377	+ 12

<u>Lamelles</u>	<u>Rapport de déposition</u>	<u>Absorbance</u>	<u>$\nu_{\frac{1}{2}}$ (cm^{-1})</u>	<u>λ_{max} (nm)</u>	<u>$\Delta\lambda_{\text{max}}$ (nm)</u>
# 1	20 heures température 283 K	0.048	7,475	371	+ 5
# 2					
# 3					
# 4					
# 1	43 heures température 283 K	0.045	7,356	370	+ 4
# 2					
# 3					
# 4					
# 1	63 heures température 283 K	0.040	7,116	369	+ 3
# 2					
# 3					
# 4					

Si on regarde les résultats obtenus pour les deux tableaux, on remarque un déplacement vers le rouge qui est sensiblement semblable à ce que l'on a observé en film solide. Notons aussi l'effet de stabilité de la monocouche en fonction de la température tout comme les films solides. On observe aussi à long terme un déplacement vers le bleu lors de la dégradation du film. Cette observation est comparable à ce que l'on a obtenu pour les films et pour le 11-cis rétinol déposé sur couche mince. Donc, on peut conclure que la surface n'est pas impliquée dans ce

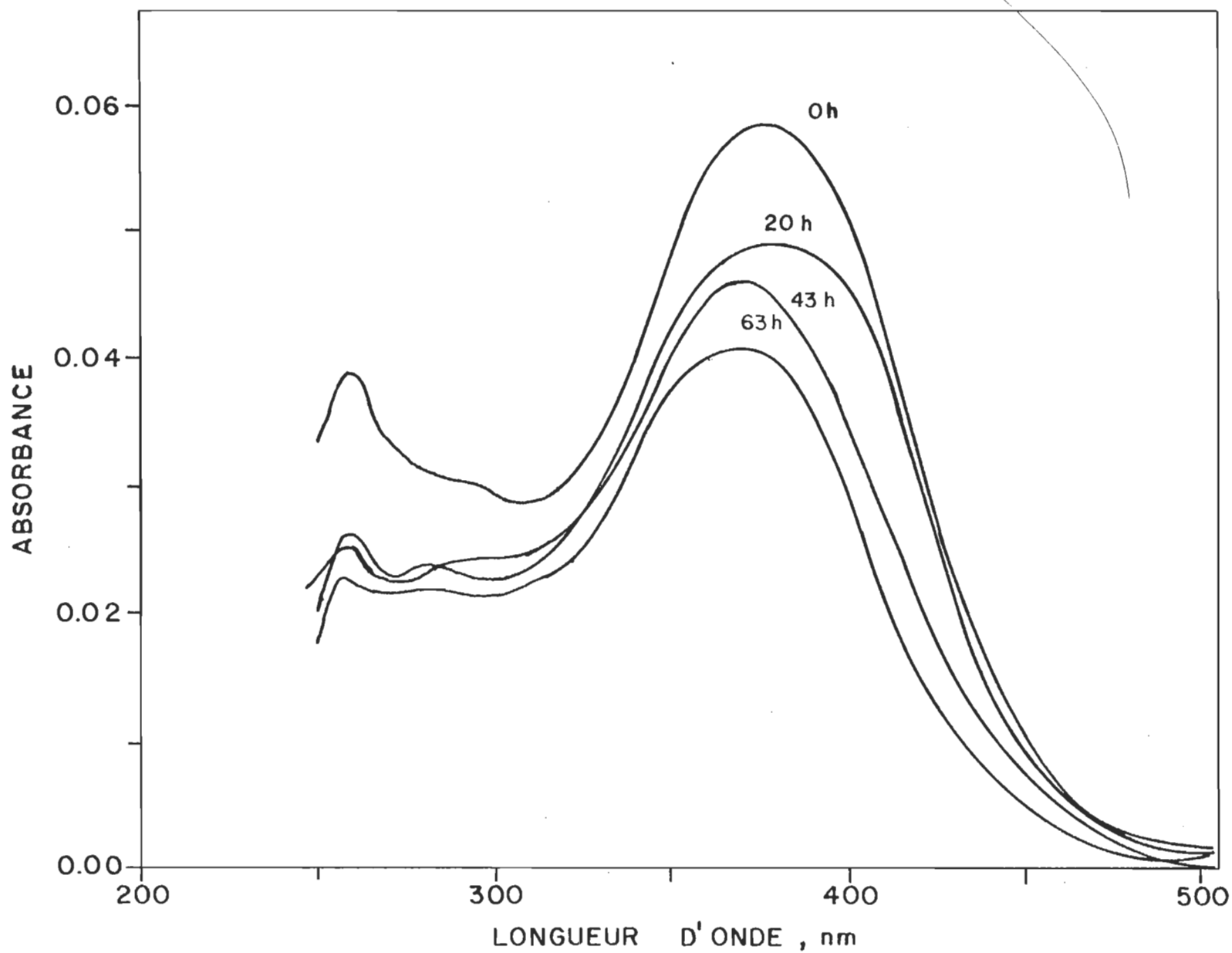


Figure 31. Spectres d'absorption du 11-cis rétinale en monocouche (intervalles de temps: 0, 20, 43, 63 heures à 283 K)

phénomène puisque le changement du type de surface n'affecte pas le processus de dégradation.

3.4.4 Discussion

Le travail en monocouche du 11-cis rétinol montre que le chromophore possède une bonne stabilité à l'interface air/solide (quartz) et que le processus de dégradation de ce composé est fonction de la température. Ce résultat est similaire à celui obtenu dans le cas de film solide de 11-cis rétinol.

L'étude en monocouche nous apporte plus de précision sur le déplacement spectral vers le rouge. Ce déplacement est observé lorsque l'on a une monocouche, mais en ajoutant plusieurs lamelles en série, le déplacement vers le rouge reste le même. Ce qui par ce fait même appuie l'hypothèse selon laquelle le déplacement spectral est produit par une interaction chromophore-chromophore. Cette interaction a lieu en film solide en augmentant la concentration, c'est-à-dire le nombre de molécules par unité de surface. Il y a donc vraiment une interaction chromophore-chromophore responsable du déplacement vers le rouge chez le 11-cis rétinol.

Lorsque l'on étudie l'effet du temps sur le 11-cis rétinol soit en chromatographie sur couche mince, en film solide ou en monocouche, l'effet est sensiblement le même. Ce chromophore a une meilleure stabilité que

les rétinols dans le temps. On remarque que le processus de dégradation est ralenti par un abaissement de température, probablement dû à une augmentation de la rigidité du système face à l'isomérisation. On peut maintenant affirmer que l'interaction chromophore-surface n'a pas beaucoup d'effet dans le processus de dégradation puisque le changement de surface ne change en rien le degré de dégradation. Il est de plus en plus certain que le processus majeur de cette dégradation est l'oxydation du produit par l'air ambiant.

3.5 Isomères de rétinol et de rétinol en solution

Les isomères étudiés sont des composés dont la forme géométrique ainsi que l'arrangement moléculaire se rapprochent du 11-cis rétinol et nous permettent de comparer les résultats. Nous avons utilisé pour cette étude le tout-trans rétinol, le tout-trans rétinol acétate et les isomères de rétinol.

3.5.1 Spectroscopie d'absorption

Les spectres d'absorption des isomères sont données à la référence de Hotchandani et coll., (1975). Dans cet article, les figures 3, 4, 5 et 6 donnent les spectres du tout-trans rétinol et de ses isomères 9-cis, 13-cis ainsi que le tout-trans rétinol dans l'éther diéthylique. Nous avons reproduit ces spectres en utilisant des solutions fraîchement préparées.

3.5.2 Spectroscopie de fluorescence

On n'observe pas de fluorescence du 11-cis rétinol en solution dans l'éther diéthylique à température ambiante, ni en film solide ni en monocouche.

3.6 Isomères de rétinol et de rétinol en film solide

Les spectres d'absorption, d'excitation et de fluorescence des isomères de rétinol et de rétinol en film solide ont été examinés. On note les différentes bandes d'absorption et d'émission de ces composés, ainsi que les changements qui surviennent en modifiant les groupements fonctionnels et la géométrie de la molécule.

3.6.1 Spectre d'absorption

Les spectres d'absorption des isomères de rétinol (tout-trans, 9-cis, 13-cis) ont déjà fait l'objet de discussion dans l'article de Hotchandani et coll.,(1976). Ce travail montre un déplacement spectral vers le rouge en film solide, déplacement qui augmente avec le nombre de molécules par unité de surface. Ce résultat correspond à ce que l'on a obtenu pour le 11-cis rétinol, il a été interprété comme étant dû à une interaction chromophore-chromophore.

Dans le cas du tout-trans rétinol et du tout-trans rétinol acétate, on note un déplacement vers le rouge comparable aux rétinals à faible concentration de chromophore tandis qu'un déplacement vers le bleu est observé aux fortes concentrations de pigments. L'effet de physiosorption à la surface du solide pourrait expliquer le déplacement vers le rouge tandis que l'interaction chromophore-chromophore serait responsable du déplacement vers le bleu (Hotchandani et coll., 1976).

3.6.2 Spectroscopie de fluorescence en film solide

Lors de l'enregistrement des spectres de fluorescence des rétinals et rétinols à l'état de film solide, nous avons examiné la polarisation de cette fluorescence afin de connaître la nature des états fluorescents.

Les films solides de tout-trans, 9-cis, 13-cis rétinals fluorescent à température de 295 K. Les figures 32, 33 et 34 montrent les spectres d'absorption, de fluorescence et d'excitation ainsi que les courbes de polarisation de fluorescence de ces composés. La présence d'un très grand déplacement de Stoke ($3\ 000 - 3\ 500\text{ cm}^{-1}$) ainsi que l'absence de structure fine dans le spectre démontre que les rétinals ont une transition Frank-Condon non-permise. Ce résultat est expliqué par un rapprochement des états $n\pi^*$ et $\pi\pi^*$. Ce rapprochement a déjà été observé pour des polyènes de type aldéhyde (Blout et Fields, 1948) et pour les hétérocycles (Hochstrasser, 1968).

Le tableau 8 donne les caractéristiques des spectres de fluorescence des rétinals en film solide ainsi que les références de travaux similaires. D'après ces résultats,

λ_{fl}	(solution, température ambiante, système non rigide)	>	λ_{fl}	(film solide, tempé- rature ambiante, système rigide)
			>	λ_{fl} (solution, 77 K, système plus rigide)

Ceci confirme que les résultats obtenus en film solide sont exacts et que ce n'est pas l'effet d'impuretés que l'on observe.

Légende de la figure 33

Spectre d'absorption (-Δ-Δ-Δ-), spectre d'excitation non-corrigé (-●-●-●-), spectre de fluorescence corrigé (—), spectre de polarisation de l'excitation (- - - -) et spectre de polarisation de l'émission (- o - o - o -) de films de 9-cis rétinol à température ambiante. Les films ont été préparés à partir de 500 μl d'une solution 5.62×10^{-5} M dans l'éther diéthylique pour les mesures spectrales d'excitation et d'émission. Quant aux expériences de polarisation, les films ont été préparés à partir de 500 μl d'une solution 5.62×10^{-4} M dans l'éther diéthylique. Les longueurs d'onde de contrôle pour les mesures de polarisation à l'excitation et à l'émission étaient fixées respectivement à 560 et 385 nm.

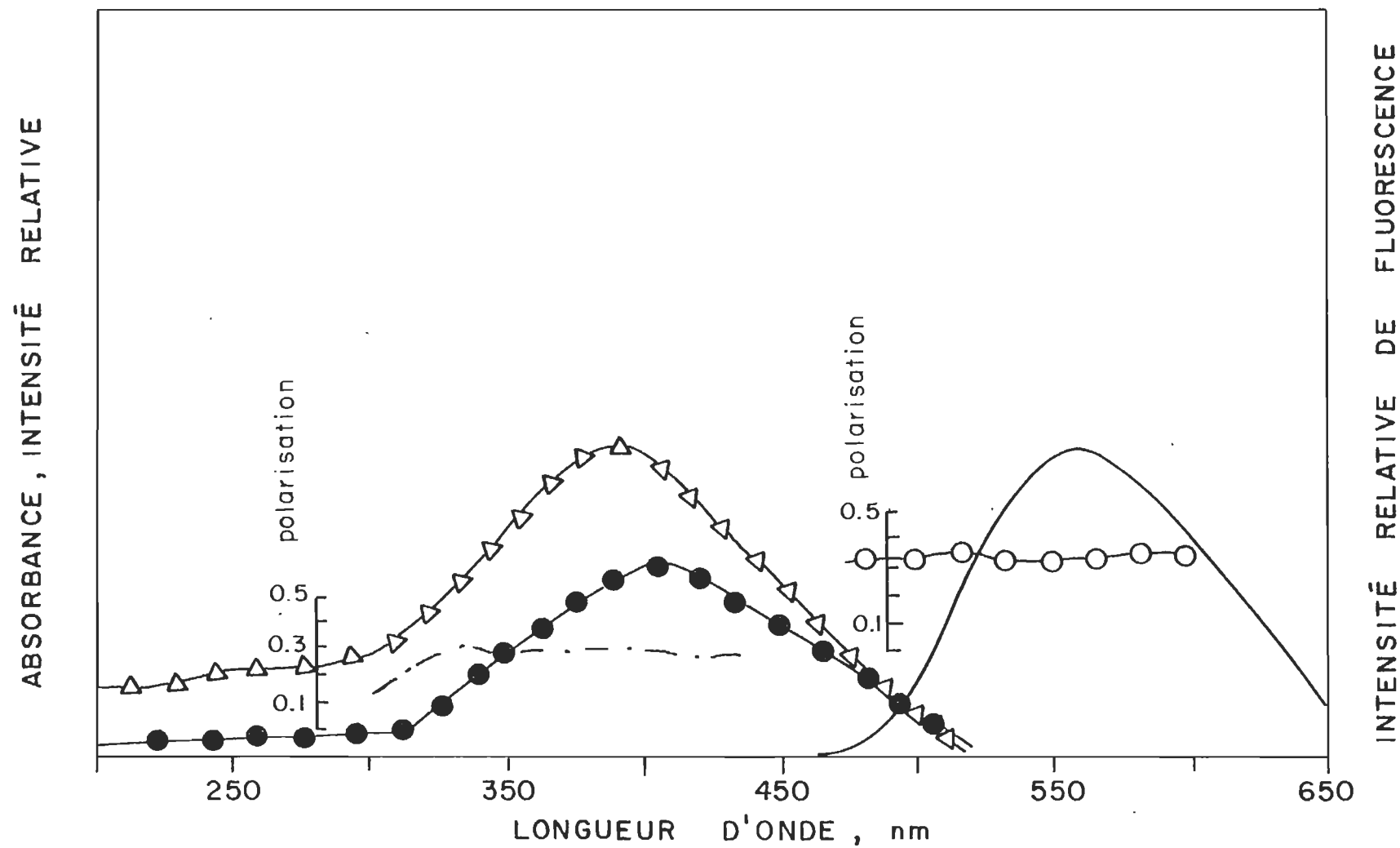


Figure 32. Tout-trans rétinale en film solide: absorption, excitation et émission

Légende de la figure 32

Spectre d'absorption (-Δ-Δ-Δ-), spectre d'excitation non-corrigé (-●-●-●-), spectre de fluorescence corrigé (—), spectre de polarisation de l'excitation (- - - - -) et spectre de polarisation de l'émission (- o - o - o -) de films de tout-trans rétinol à température ambiante. Les films ont été préparés à partir de 500 µl d'une solution 3.403×10^{-5} M dans l'éther diéthylique pour les mesures spectrales d'excitation et d'émission. Quant aux expériences de polarisation, les films ont été préparés à partir de 500 µl d'une solution 3.403×10^{-4} M dans l'éther diéthylique. Les longueurs d'onde de contrôle pour les mesures de polarisation à l'excitation et à l'émission étaient fixées respectivement à 550 et 410 nm.

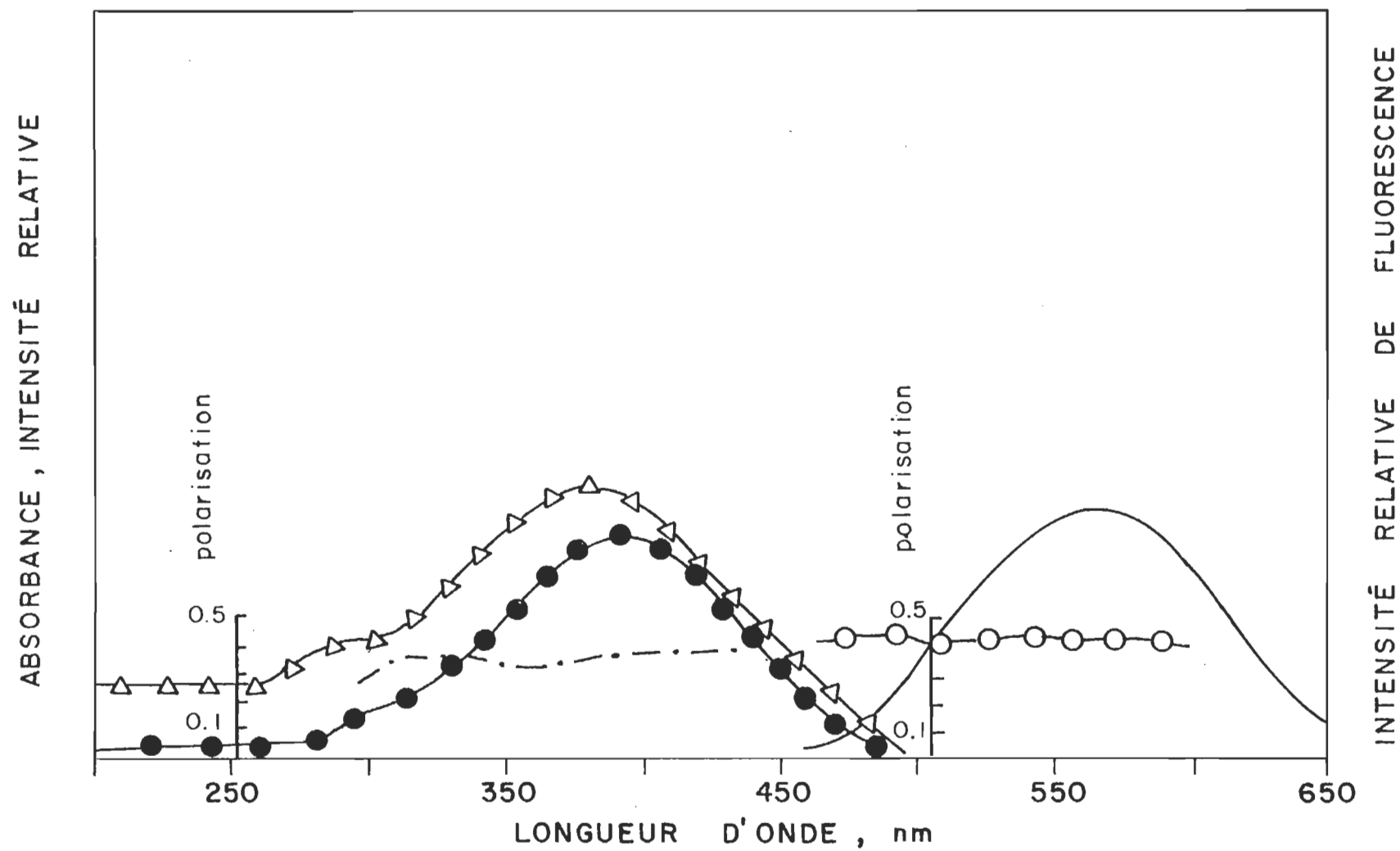


Figure 33. 9-Cis rétinol en film solide: absorption, excitation et émission

Légende de la figure 34

Spectre d'absorption ($-\Delta-\Delta-\Delta-$) , spectre d'excitation non-corrigé ($-\bullet-\bullet-\bullet-$), spectre de fluorescence corrigé (—), spectre de polarisation de l'excitation ($- - - - -$) et spectre de polarisation de l'émission ($- o - o - o -$) de films de 13-cis rétinol à température ambiante. Les films ont été préparés à partir de 500 μ l d'une solution 1.258×10^{-5} M dans l'éther diéthylique pour les mesures spectrales d'excitation et d'émission. Quant aux expériences de polarisation, les films ont été préparés à partir de 500 μ l d'une solution 1.258×10^{-4} M dans l'éther diéthylique. Les longueurs d'onde de contrôle pour les mesures de polarisation à l'excitation et à l'émission étaient fixées respectivement à 540 et 400 nm.

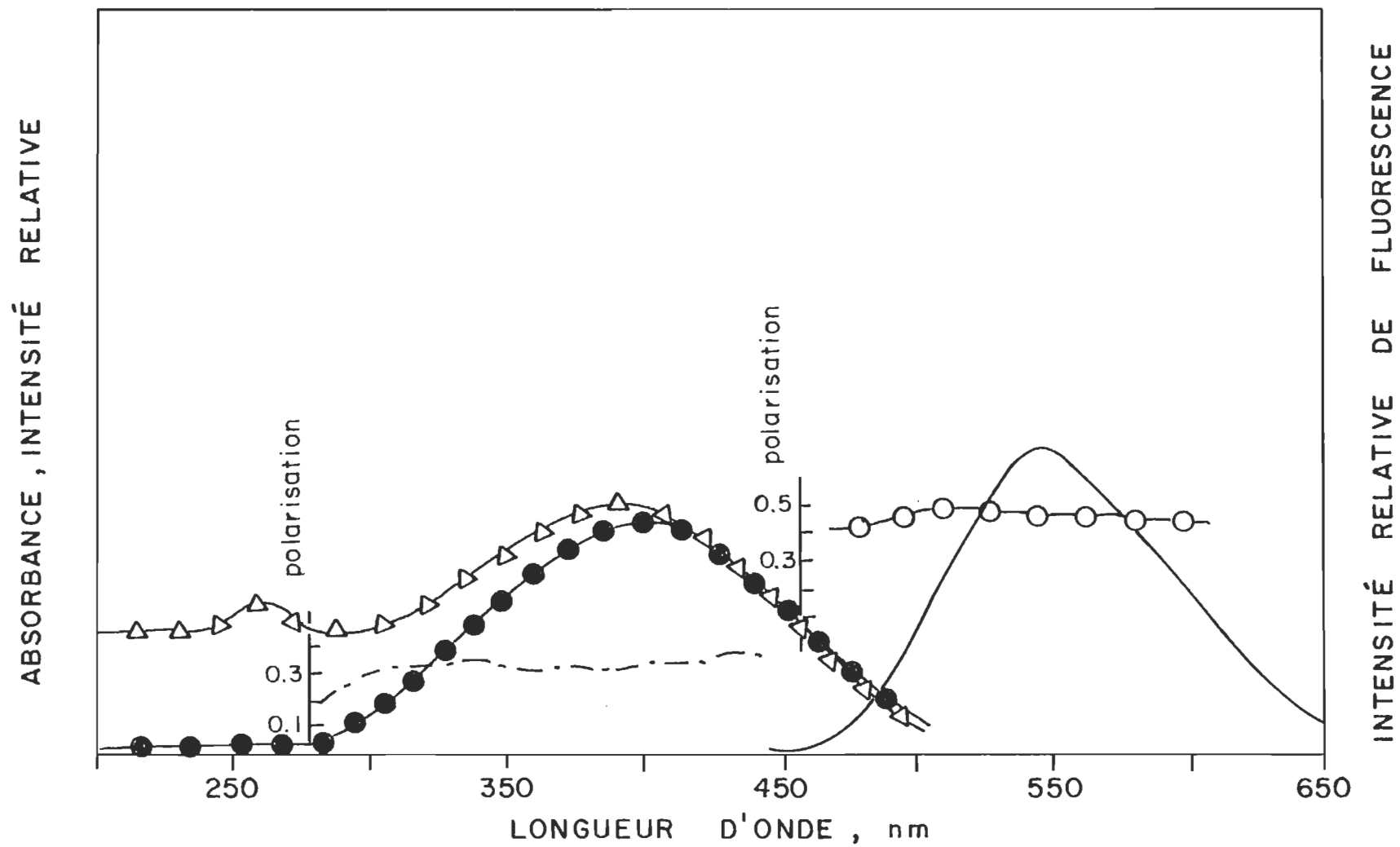


Figure 34. 13-Cis rétinale en film solide: absorption, excitation et émission

TABLEAU 8

Propriétés de fluorescence des rétinals

Composé	Films solides à température ambiante (Présent travail)					λ_{\max} (nm)	λ_{\max} (nm)
	Absorption maximum (nm)	Excitation (non-corrigée) maximum (nm)	Fluorescence (corrigée) maximum (nm)	Fluorescence Polarisation lorsqu'excité dans la principale bande d'absorption $\lambda_{\text{Bu}} \leftarrow \lambda_{\text{Ag}}$	Excitation Polarisation dans la région 320 - 450 nm	Fluorescence (corrigée) 295 K	Fluorescence (corrigée) 77 K (± 10 nm)
Out-trans rétinol	395	405	545 ± 10	+ 0.30 - + 0.38	+ 0.20 - 0.25	600 ± 25 ^{B₄} (EPA)	510 (3MP) ^{B₁, B₂} 520 (3MP) ^{B₃} 540 (EPA) ^{B₃}
9-cis rétinol	380	390	555 ± 10	~ + 0.40	~ + 0.20		520-525 (3MP) ^{B₁, B₂}
13-cis rétinol	390	400	535 ± 10	~ + 0.40	+ 0.30 - 0.32		505 (3MP) ^{B₁, B₂}

B₁: Becker et coll. (1971); B₂: Waddell et coll. (1973); B₃: Takemura et coll. (1976); B₄: Becker et coll. (1976).

Lorsque l'excitation est faite dans la région maximale de la transition ${}^1\text{Bu} \leftarrow {}^1\text{Ag}$, on obtient une valeur positive ($P = +0.40$) pour la polarisation de la fluorescence. De plus, la polarisation positive dans la région d'excitation de 320-450 nm montre que l'état responsable de l'absorption et de l'émission est le même.

Ce résultat prouve que la transition observée est de type ${}^1\text{Bu} \leftarrow {}^1\text{Ag}$ et elle est en accord avec la théorie d'orbitale moléculaire (Platt, 1956).

Par contre, les résultats que nous obtenons ne concordent pas avec les hypothèses selon lesquelles la transition proviendrait d'états de plus bas niveau d'énergie tel que $n\pi^*$ ou $\pi\pi^*$ (${}^1\text{Ag}^-$) de faible probabilité. Mais, il est possible que chez les rétinals, les trois états soient très près les uns des autres et qu'il y ait un couplage vibronique dû aux interactions entre ces états. Ce couplage vibronique expliquerait la valeur positive de polarisation pour les films solides (Hotchandani et coll., 1978).

Les spectres des films solides du tout-trans rétinol et de l'acétate de rétinol à la température de la pièce ont aussi été pris. Les figures 35 et 36 donnent les spectres d'absorption, de fluorescence, d'excitation et d'émission respectivement pour ces deux composés. On note aussi dans ces figures les valeurs de polarisation d'excitation et d'émission de fluorescence.

Dans le tableau 9, nous reportons les valeurs obtenues dans les figures 35 et 36 ainsi que quelques références servant de comparaison. Les résultats de ce tableau nous montrent que le produit utilisé était d'une bonne pureté.

Légende de la figure 35

Spectre d'absorption (-Δ-Δ-Δ-), spectre d'excitation non-corrigé (-●-●-●-), spectre de fluorescence corrigé (—), spectre de polarisation de l'excitation (- - - - -) et spectre de polarisation de l'émission (- o - o - o -) de films de tout-trans rétinol à température ambiante. Les films ont été préparés à partir de 200 μl d'une solution 2.52×10^{-6} M dans l'éther diéthylique pour les mesures spectrales d'excitation et d'émission. Quant aux expériences de polarisation, les films ont été préparés à partir de 200 μl d'une solution 2.52×10^{-5} M dans l'éther diéthylique. Les longueurs d'onde de contrôle pour les mesures de polarisation à l'excitation et à l'émission étaient fixées respectivement à 500 et 345 nm.

Spectre de fluorescence corrigé (- - -) d'une solution de rétinol dans l'éther diéthylique à la température ambiante.

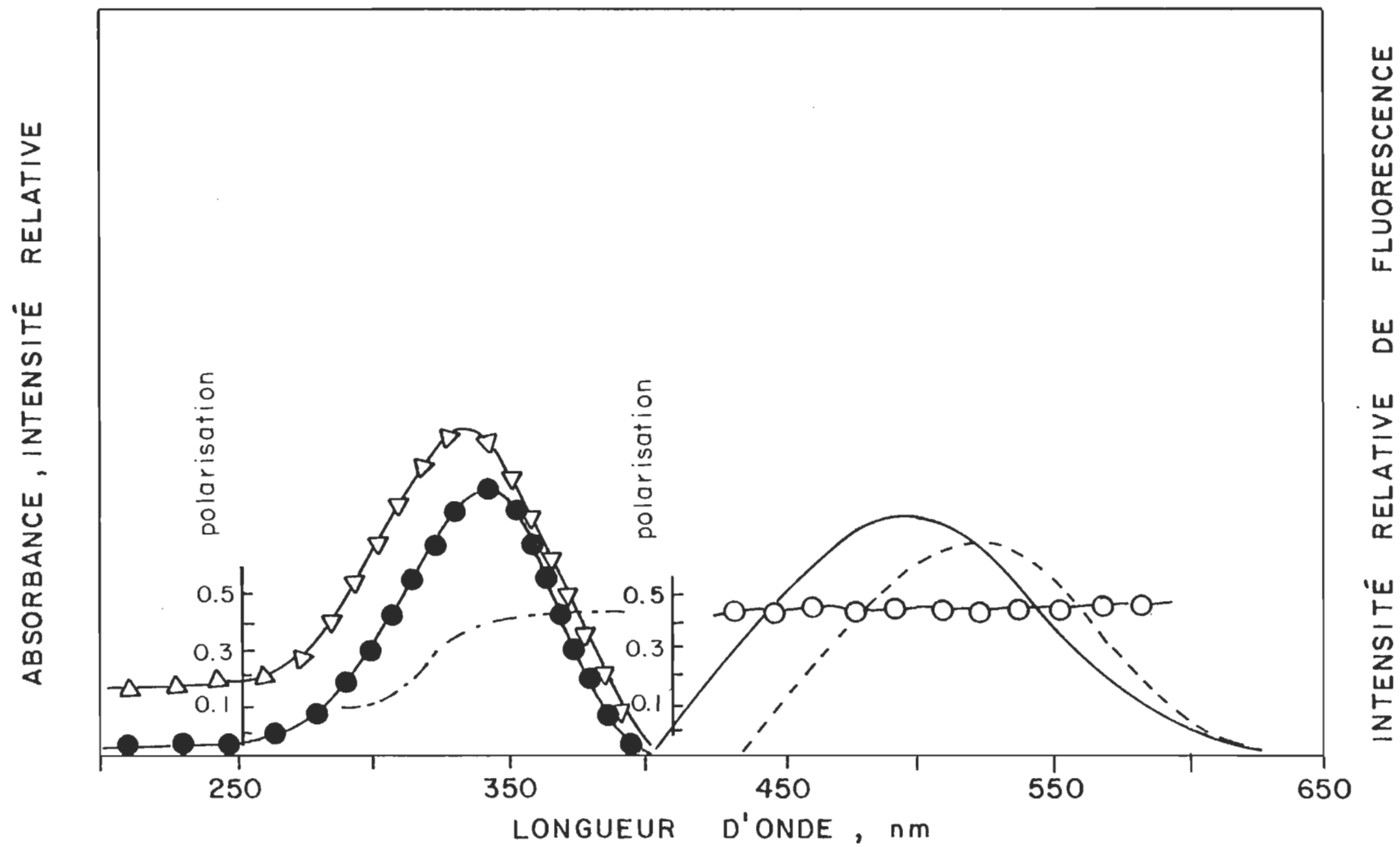


Figure 35. Tout-trans rétinol en film solide: absorption, excitation et émission

Légende de la figure 36

Spectre d'absorption (-Δ-Δ-Δ-), spectre d'excitation non-corrigé (-●-●-●-), spectre de fluorescence corrigé (——), spectre de polarisation de l'excitation (- - - - -) et spectre de polarisation de l'émission (- o- o- o-) de films de tout-trans rétinol acétate à température ambiante. Les films ont été préparés à partir de 200 µl d'une solution 2.83×10^{-6} M dans l'éther diéthylique pour les mesures spectrales d'excitation et d'émission. Quant aux expériences de polarisation, les films ont été préparés à partir de 200 µl d'une solution 2.83×10^{-5} M dans l'éther diéthylique. Les longueurs d'onde de contrôle pour les mesures de polarisation à l'excitation et à l'émission étaient fixées respectivement à 500 et 345 nm.

Spectre de fluorescence corrigé (- - -) d'une solution de trans-rétinol acétate dans l'éther diéthylique à la température ambiante.

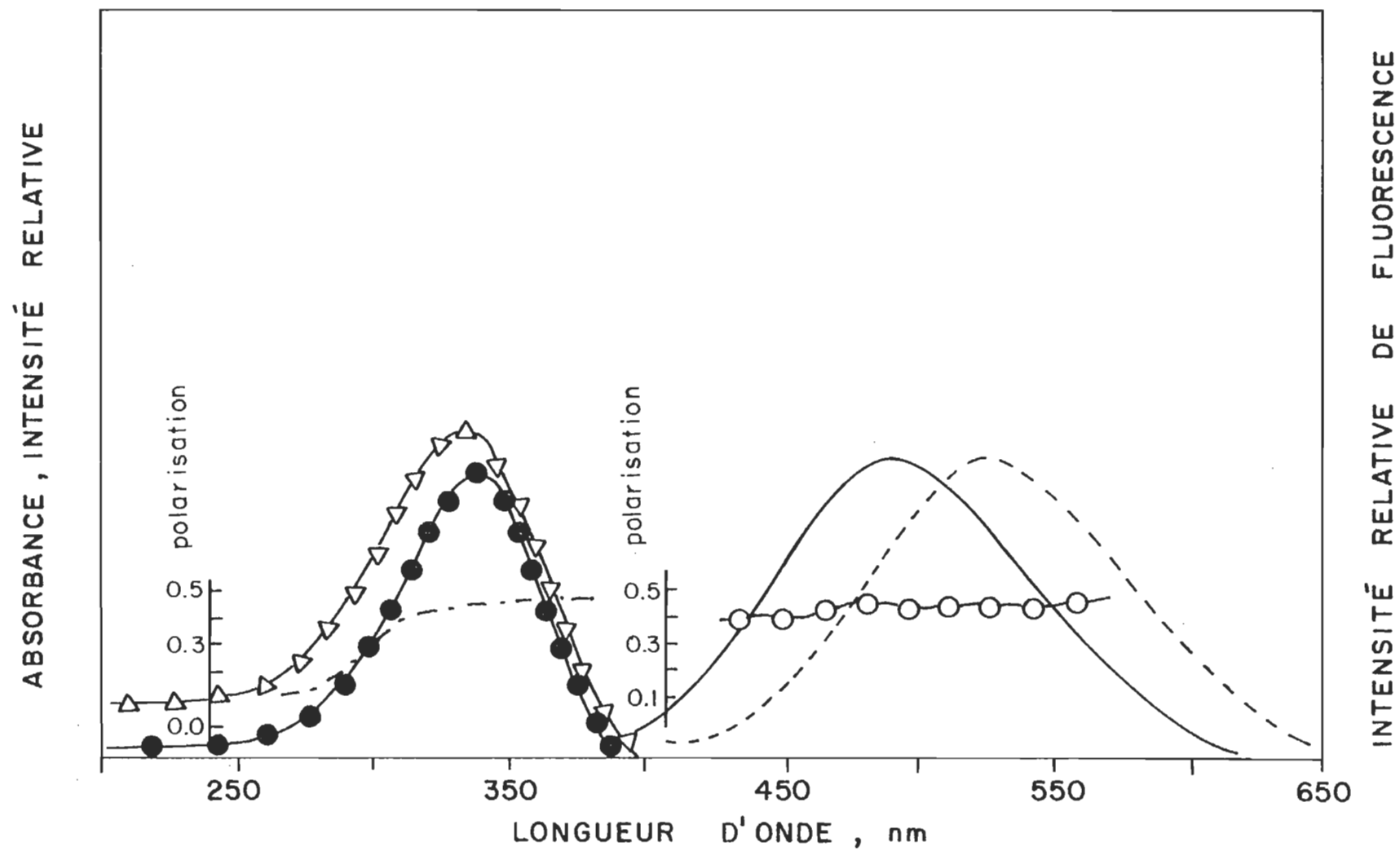


Figure 36. Tout-trans rétinol acétate en film solide: absorption, excitation et émission

TABLEAU 9

Propriétés de fluorescence des rétinoles

Composé	Films solides à température ambiante (Présent travail)					Solution	
	Absorption maximum (nm)	Excitation (non-corrigée) maximum (nm)	Fluorescence (corrigée) maximum (nm)	Fluorescence Polarisation dans la région 320 - 400 nm ($\lambda_{\text{réf.}} = 500 \text{ nm}$)	Excitation Polarisation lorsqu'excité dans la principale bande d'absorption $I_{\text{Bu}} \leftarrow I_{\text{Ag}}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 345 \text{ nm}$)	Fluorescence (corrigée) maximum (nm) 295 K	Fluorescence (corrigée) maximum 77 K
out-trans rétinol	335	342	495	+ 0.30 - 0.40	+ 0.40 - 0.42	~ 515-517 ^C ~ 510-512 ^{D, E}	~ 480 ^{D, E}
out-trans rétinol acétate	335	340	490	+ 0.30 - 0.35	+ 0.40 - 0.45	~ 515 ^C ~ 510 ^{D, E}	~ 475 ^{D, E}

: Présent travail; D: Thomson, 1969; E: Dalle et Rosenberg, 1970.

Dans le cas des rétinoles, les résultats sont comparables à ceux obtenus pour les rétinales, soit des valeurs de polarisation positive ($P = + 0.45$) ce qui indique la présence de symétrie dans les oscillateurs d'absorption et d'émission. Donc, l'état responsable de l'excitation provient de la transition ${}^1\text{Bu} \leftarrow {}^1\text{Ag}$.

Il est à noter qu'à l'aide de techniques spécialisées comme la spectroscopie biphotonique il serait possible de voir si l'on n'a pas un couplage vibronique entre les différents états (Siebrand, 1978)*.

Dans les résultats que l'on a obtenu pour l'étude de la fluorescence des rétinoles, la bande d'excitation maximum se déplace vers le rouge lorsque l'on augmente la concentration du film. Ce résultat est en accord avec la théorie d'interaction chromophore-chromophore. Par contre, pour le spectre d'absorption, la bande maximum se déplace vers le bleu. Ce déplacement vers le bleu pour les films et les monocouches est attribuable à l'oxydation des polyènes causée par la présence de traces d'oxygène.

Récemment, on reportait les spectres d'absorption en monocouche des polyènes (Hotchandani et coll., 1975). Les déplacements des bandes maximums d'absorption soit vers le bleu ou vers le rouge pour les rétinales et les rétinoles en comparaison avec les spectres en solution ont été expliqués sur la base d'une interaction chromophore-chromophore entre les molécules.

* Siebrand, W. 1978. Communication privée.

L'étude en film solide des polyènes (Hotchandani et coll., 1976) a démontré que dans le cas des rétinals et rétinols, on observe un déplacement vers le rouge avec des concentrations faibles (un effet de physiosorption). Cependant, lorsque l'on augmente la concentration du film, on observe un déplacement vers le rouge dans le cas du film de rétinol et un déplacement vers le bleu pour le rétinol. C'est pourquoi ces déplacements dans le passé ont été interprétés en terme d'interaction chromophore-chromophore.

La question qui se posait était de savoir pourquoi les composés comme les rétinols dont la configuration électronique ainsi que l'arrangement moléculaire se rapprochent beaucoup du rétinol résultaient en un déplacement contraire à ce que l'on observe dans le cas des rétinals. Par des études de fluorescence de film solide, on a observé des résultats significatifs. Lors des mesures spectroscopiques des films solides de rétinols, on a noté une différence marquée entre λ_{max} d'absorption (290 nm) et λ_{max} d'excitation (340-360 nm) pour des films préparés à partir de solutions dont la concentration était de $\sim 10^{-3}$ M. En considérant le fait que le spectre d'excitation n'a pas été corrigé en fonction de la réponse du photomultiplicateur et du monochromateur, il est normal d'avoir un léger déplacement, mais certainement pas de l'ordre de 50 nm. Dans le cas des solutions de rétinols ($\sim 10^{-6}$ M) et de rétinals (10^{-3} - 10^{-5} M), on n'observe pas ce déplacement entre λ_{max} d'excitation et λ_{max} d'absorption. Donc, il est apparent que l'étude en fluorescence de films préparés à partir d'une concentration

10^{-3} M de rétinols montre un déplacement anormal vers le bleu. Ce déplacement spectral serait causé par l'autooxydation du composé (Hotchandani et coll., 1978).

La figure 37 montre le spectre d'absorption du trans-rétinol et le spectre d'excitation pour une solution 10^{-6} M dans l'éther diéthylique à la température de la pièce. On note le rapprochement des λ_{max} à faible concentration. La figure 38 représente les spectres d'excitation de solutions de tout-trans rétinol à différentes concentrations, soit 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} et 10^{-2} M.

Comme on peut le remarquer à la figure 38, la bande d'excitation maximum se déplace vers le rouge lorsque l'on augmente la concentration. Cette observation est produite par une augmentation de molécules par unité de surface ce qui favorise une interaction chromophore-chromophore. Le déplacement vers le rouge est en accord avec la théorie de l'exciton où $\Delta\nu \propto \frac{1}{R^3}$, $\Delta\nu$ est le déplacement spectral et R est l'espace intermoléculaire (McRae et Kasha, 1964). Le spectre de fluorescence dans ce cas se déplace aussi vers le rouge (voir figure 39).

Cependant, les spectres d'absorption de ces mêmes films ont tendance à se déplacer vers les basses longueurs d'onde et produisent un déplacement vers le bleu (Hotchandani et Leblanc, 1976). Par contre, lorsque l'on enregistre les mesures de fluorescence et d'excitation, on observe un déplacement vers le rouge (figure 40).

Légende de la figure 37

Spectres de films de tout-trans rétinol préparés à partir de
300 μl d'une solution 2.931×10^{-6} M dans l'éther diéthylique:

Absorption (2), $\lambda_{\text{max}} = 335$ nm; excitation non-corrigée (3), $\lambda_{\text{max}} = 340$ nm;
fluorescence corrigée (4), $\lambda_{\text{max}} = 495$ nm.

Spectres d'absorption (1) de la solution 2.931×10^{-6} M, $\lambda_{\text{max}} = 325$ nm;
de fluorescence corrigée (5), $\lambda_{\text{max}} = 515$ nm.

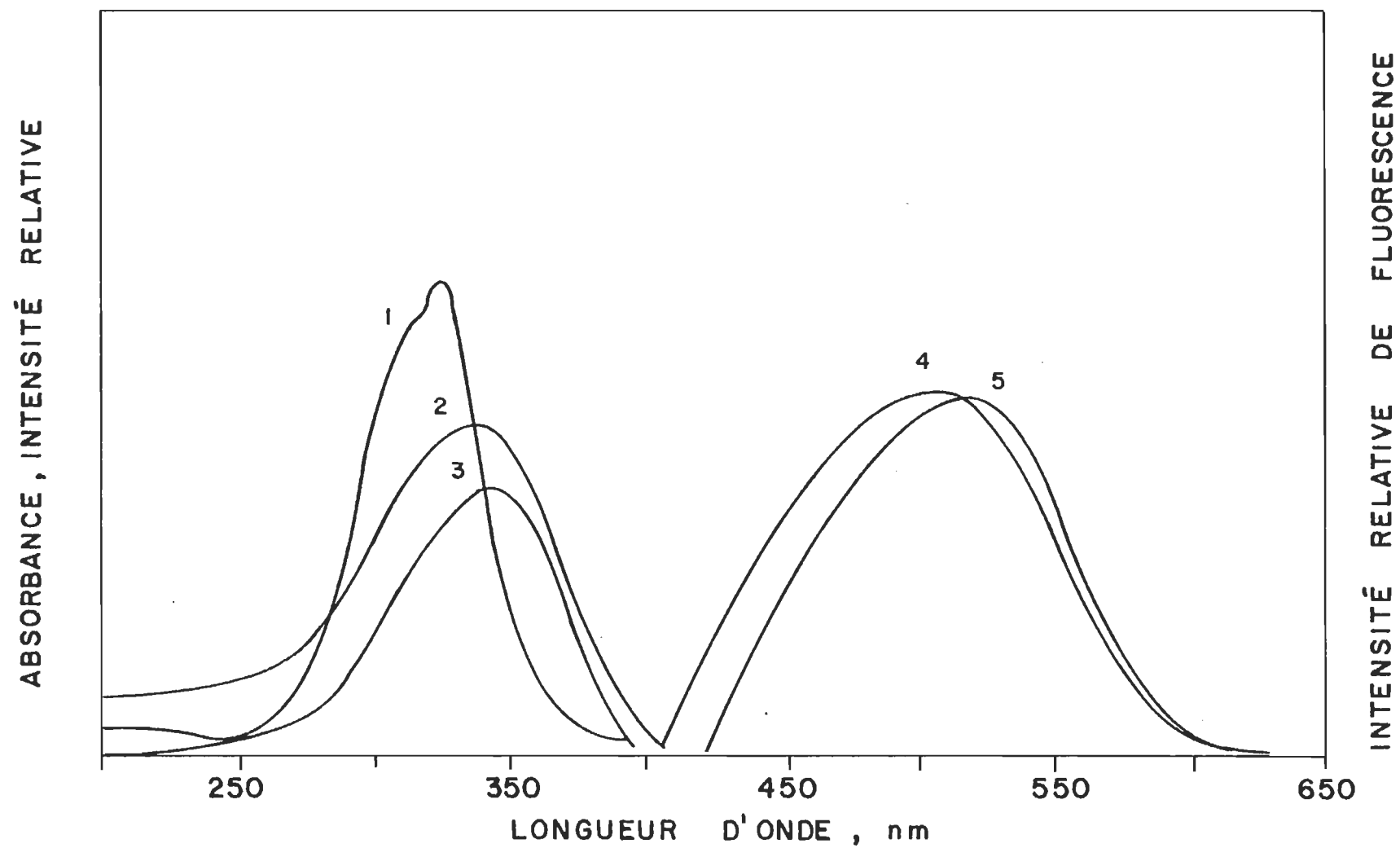


Figure 37. Spectres d'absorption et d'excitation du trans rétino1 (10^{-6} M) dans l'éther diéthylique

Légende de la figure 38

Spectres d'excitation non-corrigée de films de tout-trans rétinol préparés à partir de 300 μl de la solution de rétinol 2.931×10^{-6} M dans l'éther diéthylique, $\lambda_{\text{max}} = 340$ nm, (1); 300 μl de 2.931×10^{-5} M, $\lambda_{\text{max}} = 343$ nm, (2); 300 μl de 2.931×10^{-4} M, $\lambda_{\text{max}} = 350$ nm, (3); 300 μl de 2.931×10^{-3} M, $\lambda_{\text{max}} = 355$ nm, (4); 300 μl de 2.931×10^{-2} M, $\lambda_{\text{max}} = 360$ nm, (5).

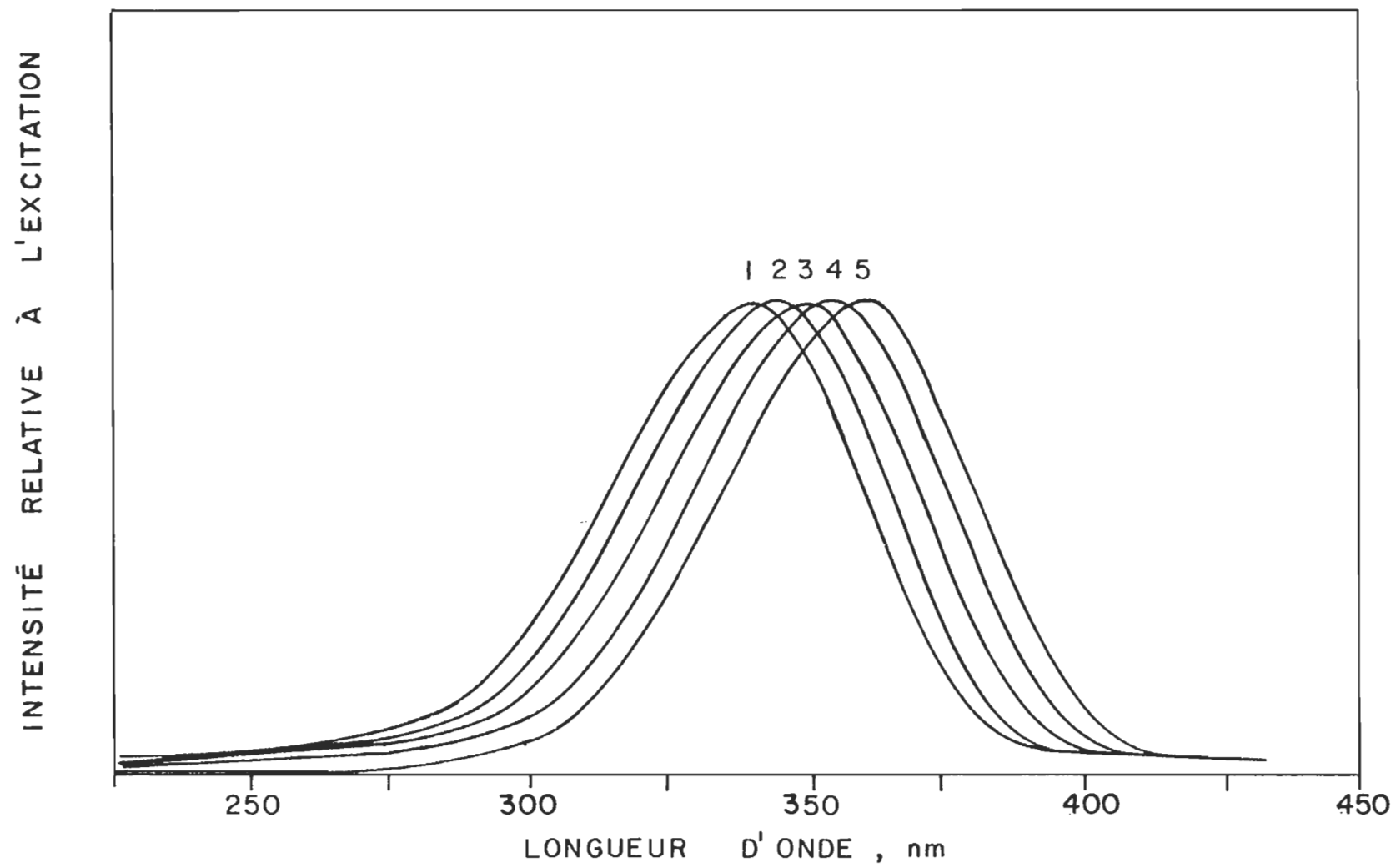


Figure 38. Spectres d'excitation du trans rétinol en fonction de la concentration

Légende de la figure 39

Spectres de fluorescence non-corrigée des films de tout-trans rétinol préparés à partir de (1) 300 μ l d'une solution de 2.931×10^{-6} M de rétinol, $\lambda_{\text{max}} = 470$ nm; (2) 300 μ l de 2.931×10^{-3} M, $\lambda_{\text{max}} = 480$ nm; (3) 300 μ l de 2.931×10^{-2} M, $\lambda_{\text{max}} = 485$ nm.

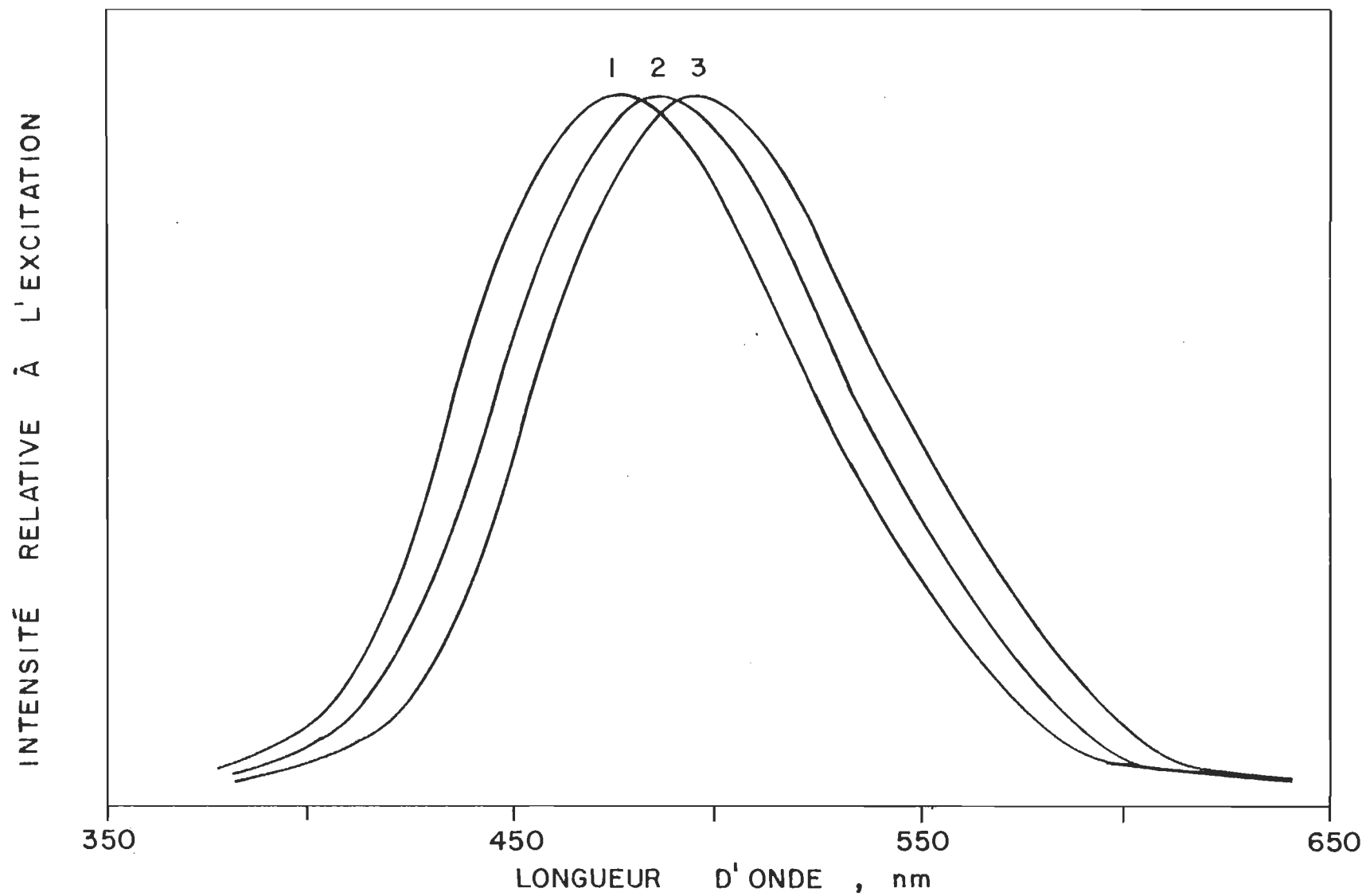


Figure 39. Spectres d'émission du trans rétinol en fonction de la concentration

Légende de la figure 40

Spectres de films de tout-trans rétinol préparés à partir d'une solution de 2.931×10^{-3} M dans l'éther diéthylique. Absorption (— — — —), $\lambda_{\text{max}} = 290$ nm; excitation non-corrigée (———), $\lambda_{\text{max}} = 357$ nm; fluorescence non-corrigée (- - -), $\lambda_{\text{max}} = 480$ nm.

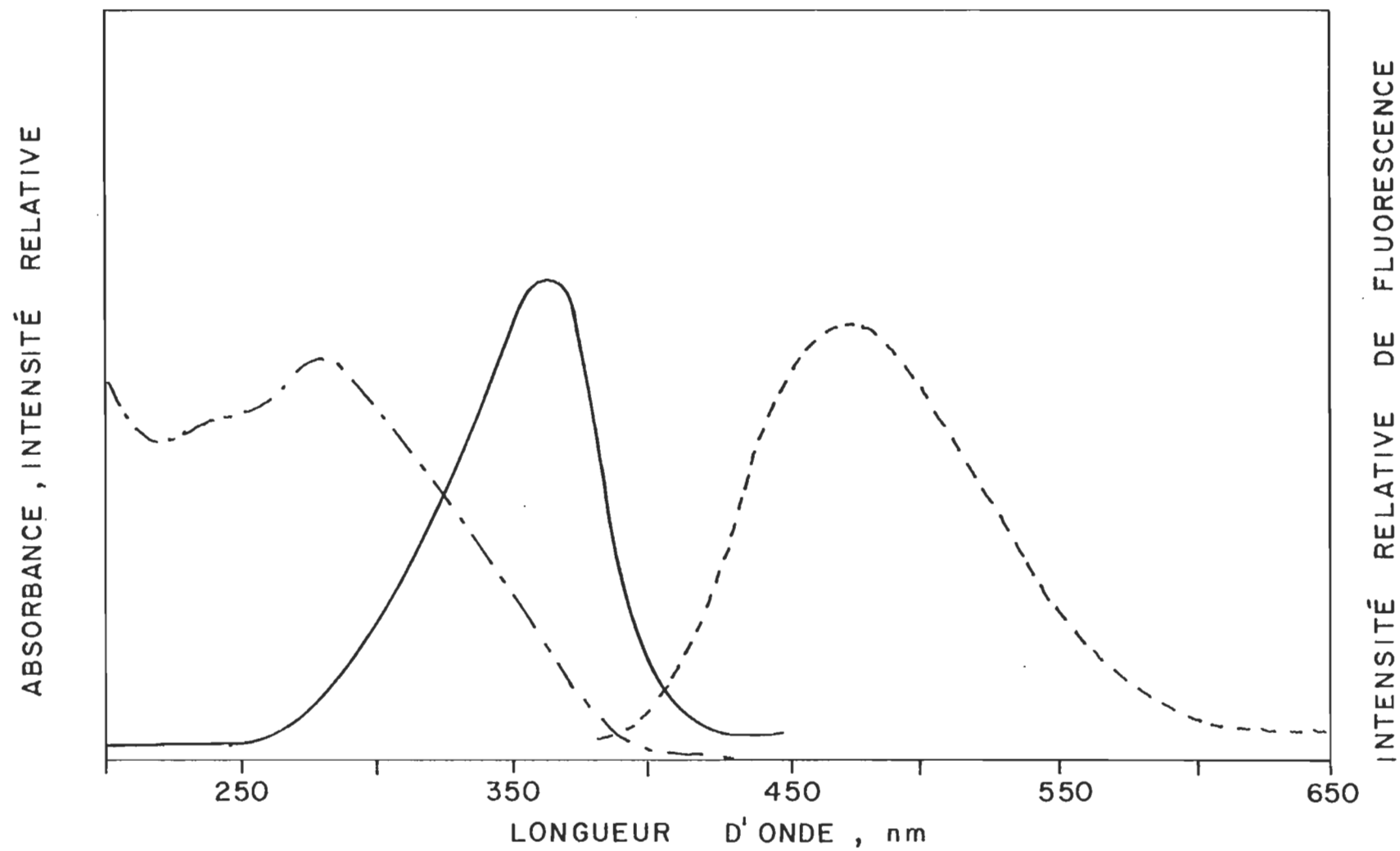


Figure 40. Tout-trans rétinol en film solide: absorption, excitation et émission

Le tout-trans rétinol a donc un déplacement vers le rouge en film solide à partir d'une solution 10^{-3} M produit par une interaction chromophore-chromophore. La bande à 290 nm pour les spectres d'absorption est le résultat d'une autooxydation produite par la présence de traces d'oxygène. Ce type de dégradation a aussi été observé dans le cas de solutions plus diluées pour préparer les films, soit 10^{-5} - 10^{-6} M, mais le déplacement spectral apparaît dans un temps plus long, soit après 30 minutes ce que l'on peut remarquer à la figure 41 en utilisant une solution 10^{-5} M.

En conclusion, les résultats précédents montrent que les spectres d'absorption des rétinoles en film solide ont un déplacement vers le rouge, déplacement qui est dû à une interaction chromophore-chromophore tandis que la bande à 290 nm est produite par une autooxydation résultant de la formation de sous-produits (Finkel'stein et coll., 1978).

Ce même type de dégradation s'effectue aussi dans le cas des rétinaux mais avec une vitesse beaucoup plus lente. Le processus responsable de la dégradation est celui de l'oxydation de polyènes.

Légende de la figure 41

Au temps $t = 0$ min, spectres de films de tout-trans rétinol:

Absorption (1), $\lambda_{\max} = 335$ nm; excitation non-correctée (2),

$\lambda_{\max} = 342$ nm; fluorescence non-correctée (3), $\lambda_{\max} = 470$ nm.

Au temps $t = 30$ min (films laissés à l'obscurité pendant cette période), les spectres (4), (5) et (6) sont respectivement

l'absorption, $\lambda_{\max} = 290$ nm, l'excitation non-correctée, $\lambda_{\max} =$

340 nm et la fluorescence non-correctée, $\lambda_{\max} = 468$ nm. Les films

ont été préparés à partir d'une solution de 2.931×10^{-5} M dans

l'éther diéthylique.

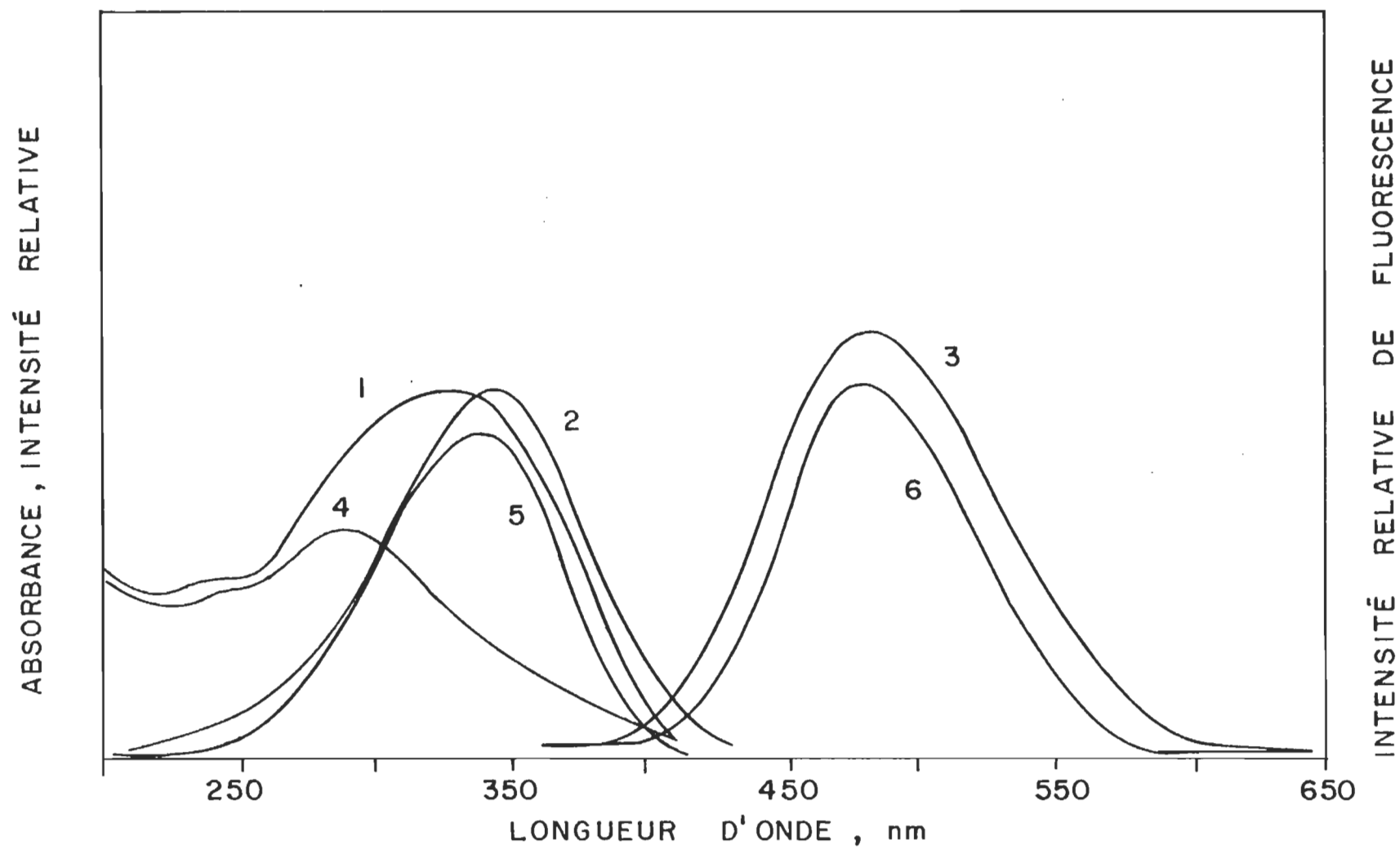


Figure 41. Déplacement de la bande d'absorption du trans rétinol après 30 min à la noirceur

3.7 Isomères de rétinol et de rétinol en monocouche

Après le travail en solution et en film solide, nous nous sommes dirigés vers une étude à l'état monomoléculaire. Les propriétés spectroscopiques de ces molécules en monocouche et multicouche nous permettent de faire certains rapprochements avec la membrane discale où l'on a un arrangement bimoléculaire.

3.7.1 Détermination de l'isotherme de pression de surface

On a procédé de la même façon que pour le 11-cis rétinol, en suivant les mêmes étapes, c'est-à-dire étalonnage, standardisation, étalement. Les résultats obtenus pour le 9-cis, 13-cis, tout-trans rétinol ainsi que le tout-trans rétinol correspondent aux résultats publiés par Hotchandani et coll. (1975).

3.7.2 Dépôt sur support solide

La déposition sur un support solide a été effectuée de la même façon que pour le 11-cis rétinol. Les spectres en monocouche ont été enregistrés.

Nous avons tenté de déposer des multicouches sur les lamelles de quartz. C'est seulement avec le tout-trans rétinol et sur une surface hydrophobe que l'on a réussi à obtenir une multicouche.

On prépare la lamelle de quartz en y déposant cinq monocouches d'arachidate de cadmium. Les rapports de déposition se situent entre 0.9 et 1.1. Ensuite, on dépose les multicouches de trans rétinol, environ 20 monocouches sur chaque face de la lamelle pour un total de 40 monocouches. Le rapport de déposition moyen est de 0.93.

3.7.3 Spectroscopie d'absorption

Les spectres d'absorption en monocouche du tout-trans, 9-cis, 13-cis rétinol et tout-trans rétinol sont identiques à ceux de Hotchandani et coll. (1975). Pour ce qui est de l'interaction chromophore-chromophore dans le cas du tout-trans, 9-cis, 13-cis rétinol les résultats sont les mêmes. En ce qui concerne le tout-trans rétinol comme nous l'avons exposé dans le cas des films solides, il y a présence d'une bande déplacée vers le bleu qui est anormale, les mesures de spectroscopie nous ont permis de déceler ce phénomène.

3.7.4 Spectroscopie de fluorescence

Il nous a été impossible de mesurer la fluorescence pour une monocouche soit d'un isomère de rétinol soit d'un isomère de rétinol.

Donc, la seule technique possible était l'utilisation des multicouches. Nous avons noté que seulement le tout-trans rétinol peut se déposer en multicouche sur une lamelle hydrophobe. On a remarqué aussi que pour le cas des films solides, seulement chez le trans rétinol on a pu mesurer un spectre de fluorescence. Etant donné qu'en spectroscopie d'absorption le tout-trans rétinol avait un déplacement vers le bleu se situant vers 290 nm, on a enregistré le spectre de fluorescence de multicouches de tout-trans rétinol.

La figure 42 présente les spectres d'absorption, d'excitation et de fluorescence du tout-trans rétinol en multicouche. On remarque que la bande d'absorption maximum est située à 290 nm ce qui est relativement éloigné de ce que l'on observe pour la bande d'excitation maximum, soit 345 nm. Cette différence est très importante. On a aussi remarqué que si l'on dépose les multicouches à différentes pressions de dépositions, soient 5, 10, 15, 22 mN m⁻¹, la bande d'absorption maximum demeure à 290 nm. Ce résultat est en contradiction avec la théorie de l'exciton qui montre que le déplacement spectral doit augmenter lorsque la distance intermoléculaire, R , décroît, $\Delta\nu \propto \frac{1}{R^3}$ (McRae et Kasha, 1964). Donc, le déplacement vers le bleu à 290 nm n'est pas le résultat d'une interaction chromophore-chromophore.

Le spectre d'absorption à 290 nm en monocouche est produit par un processus de dégradation similaire à ce que l'on observe dans le

Légende de la figure 42

Spectres de multicouche de tout-trans rétinol. Le nombre de monocouches déposées est de 40 à la pression de surface de 22 mN m^{-1} . Absorption (— — — — —), $\lambda_{\text{max}} = 290 \text{ nm}$; excitation non-corrigée (———), $\lambda_{\text{max}} = 345 \text{ nm}$; fluorescence non-corrigée (- - -), $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$.

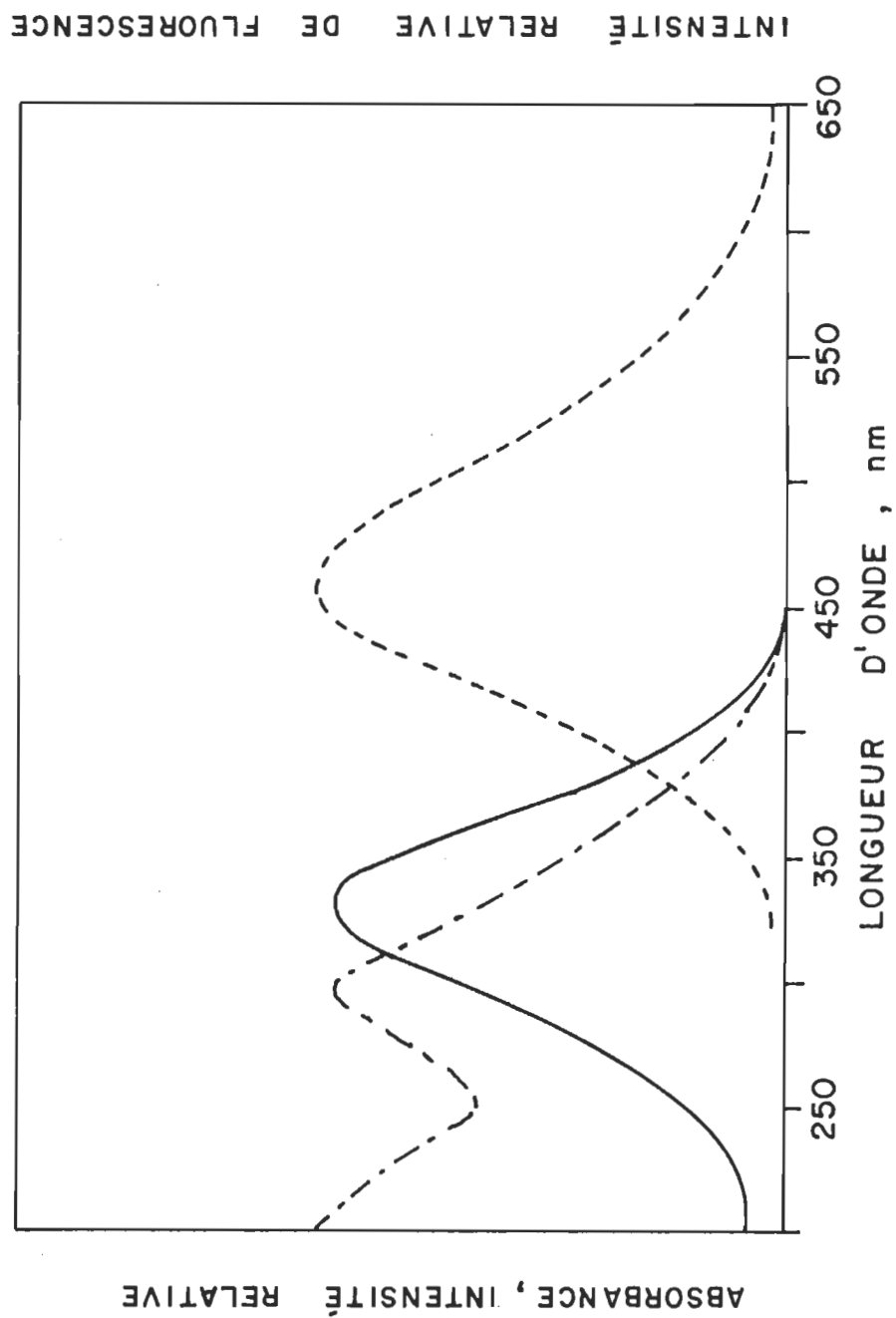


Figure 42. Tout-trans rétinol en multicouche (arrangement de 40 monocouches): absorption, excitation et émission.

cas des films solides. Cette dégradation est produite probablement pendant la déposition de la monocouche à l'interface air/solide. Comme l'ensemble des manipulations prend environ 30 minutes, nous avons un temps suffisamment long pour favoriser l'oxydation de la monocouche ou de la multicouche.

En conclusion, les résultats précédents démontrent que pour les monocouches ou les films solides de tout-trans rétinol, il y a un déplacement vers le rouge similaire à ce que l'on observe pour les rétinals. Quant au déplacement vers le bleu, il est le résultat d'un sous-produit formé lors de l'autooxydation, sous-produit qui absorbe fortement à 290 nm.

3.8 Etude des mélanges 11-cis rétinol/phospholipides

Suite à l'étude de la stabilité thermique et de l'effet de l'oxygène contenu dans l'air ambiant sur le 11-cis rétinol à l'état de film solide ou à l'état monomoléculaire, nous avons étudié les mélanges 11-cis rétinol/phospholipides à l'interface air/eau.

Nous rapportons dans la présente section les résultats obtenus pour des mélanges binaires, soit le 11-cis rétinol et les différents phospholipides rencontrés dans la membrane discale.

L'étude en monocouche permet d'examiner la possibilité d'interaction entre différents constituants de la membrane discale. On simule une partie de la bicouche du photorécepteur visuel par une telle étude.

L'étude des mélanges s'est effectuée avec l'éther diéthylique de grade Aristar comme solvant de déposition. La sous-phase utilisée est un tampon Tris-HCl, pH 7.2. Dans toutes les expériences, la température est de 20 - 21°C.

3.8.1 11-Cis rétinol/phosphatidyléthanolamine

Le 11-cis rétinol est un polyène aldéhyde qui contient une chaîne à doubles liaisons conjuguées dont on a déterminé l'orientation à l'interface air/eau à la figure 28. La phosphatidyléthanolamine est un phospholipide qui a la structure suivante: il contient un groupement éthanolamine comme groupement terminal ainsi que du phosphore, un triglycéride auquel est relié deux chaînes d'acide gras dont on ne connaît pas la longueur précise, ni le nombre d'insaturations puisque ce produit provient d'extraits naturels. On présente à la figure 43 l'isotherme de la phosphatidyléthanolamine pure à l'interface air/eau. On obtient une aire limite, A_0 de $91 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$ en admettant que le poids moléculaire de la PE est de 800 g.

Afin de déterminer s'il y a une interaction entre le 11-cis et la PE, nous avons étudié la série de mélanges suivants:

11-cis rétinol: PE	0	:	1.0
	0.2	:	0.8
	0.5	:	0.5
	0.8	:	0.2
	1.0	:	0

La figure 43 donne les isothermes de pression de surface des deux composés purs, c'est-à-dire le 11-cis rétinol et la PE.

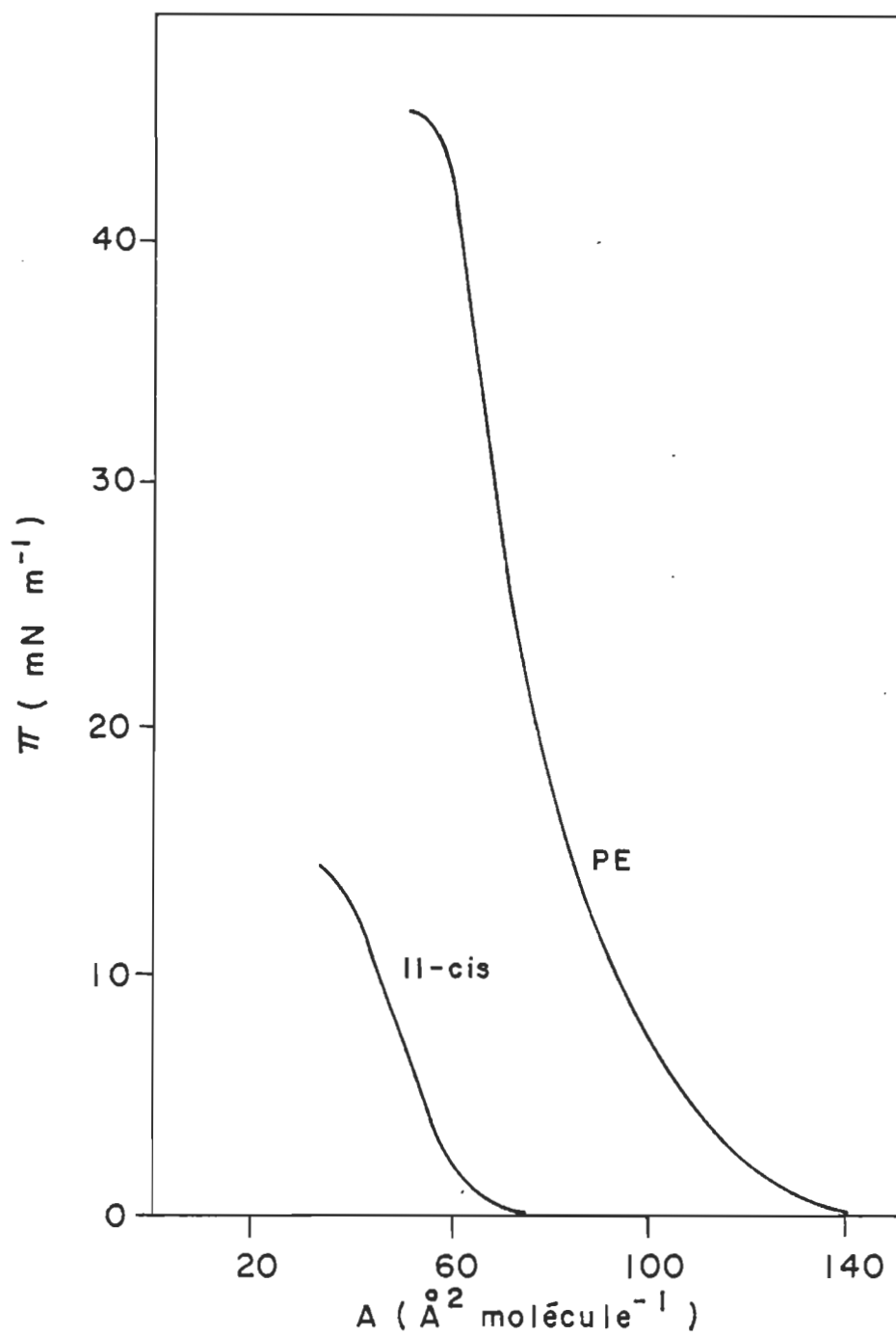


Figure 43. Isothermes de pression de surface du 11-cis rétinol (11-cis) et de la phosphatidyléthanolamine (PE).

Quant aux trois mélanges, soient 0.2:0.8, 0.5:0.5 et 0.8:0.2, les figures 44, 45 et 46 montrent que le 11-cis rétinol est miscible dans la PE si on compare la courbe théorique à la courbe expérimentale pour des pressions variant de 0 à 14 mN m^{-1} . Cependant, si on regarde ce qui se passe pour ces différents mélanges lorsqu'on dépasse la courbe théorique, on remarque qu'en augmentant la concentration du 11-cis rétinol, il y a abaissement de la pression de surface dans la région du collapse. Ce résultat expérimental prouve qu'il existe une interaction entre le polyène et le phospholipide. On note aussi l'apparition d'un point d'inflexion dans la courbe lorsque l'on augmente la fraction molaire du 11-cis rétinol, en particulier le mélange 0.8:0.2. Ce phénomène serait relié au processus de "squeeze out". Les molécules de 11-cis rétinol sont expulsées de la monocouche lorsque l'on atteint de trop grandes pressions de surface. Nous pouvons vérifier ce phénomène par le calcul suivant:

Considérons le mélange 11-cis : PE, 0.2:0.8. En se référant à l'isotherme de la figure 44, l'aire moléculaire à 44 mN m^{-1} , A_{44} , correspond à $51.5 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$. En considérant que le "squeeze out" a expulsé tout le 11-cis rétinol, on calcule ainsi le A_{44} de la PE pure,

$$\begin{array}{rcl}
 A_{44} \text{ mélange} & = & 51.5 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1} \rightarrow 0.8 \text{ PE} \\
 & & \times \quad \quad \quad \rightarrow 1.0 \text{ PE} \\
 1.0 \text{ de PE} & \text{correspond à} & 64.4 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}
 \end{array}$$

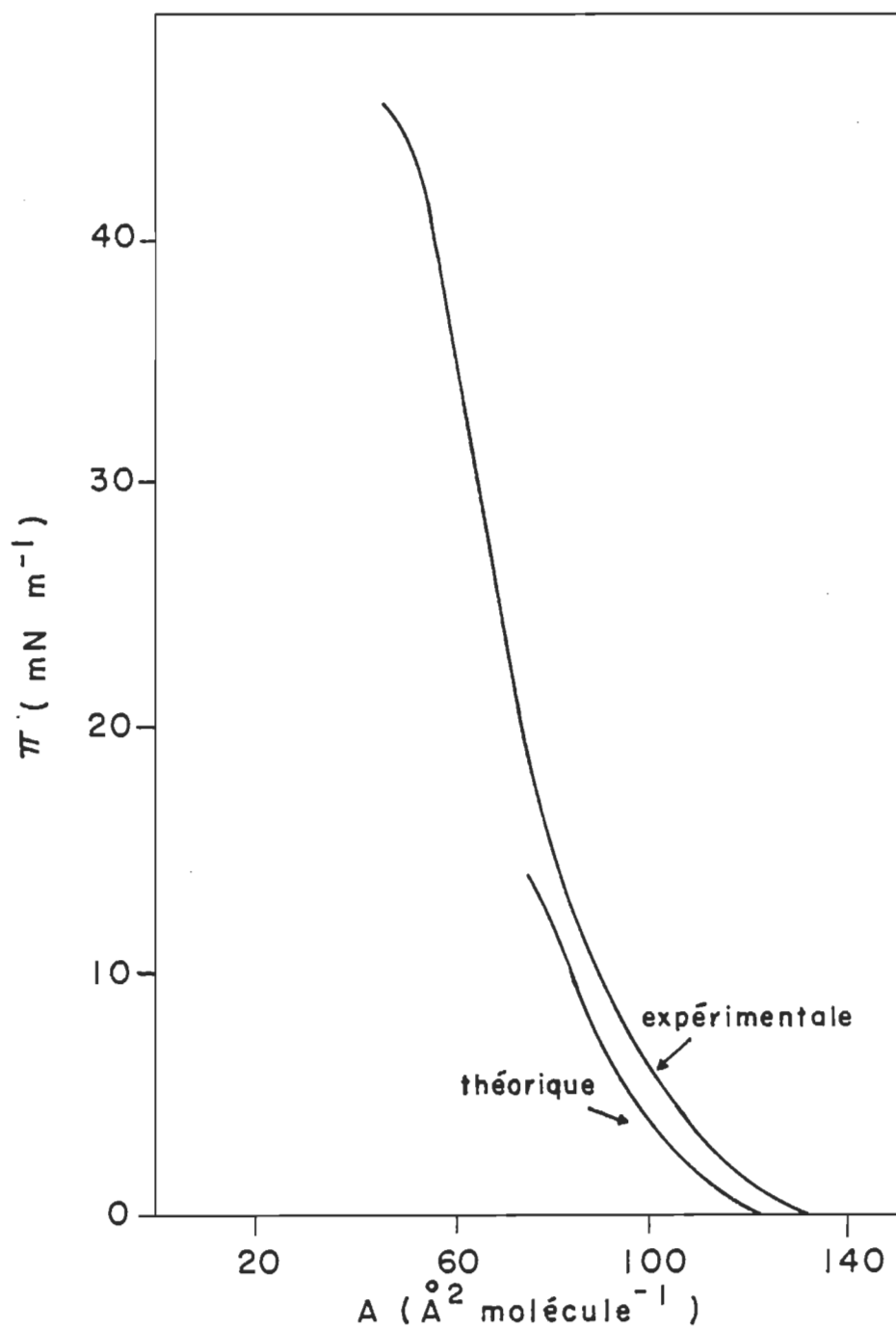


Figure 44. Isothermes de pression de surface: 0.2 11-cis/0.8 PE.

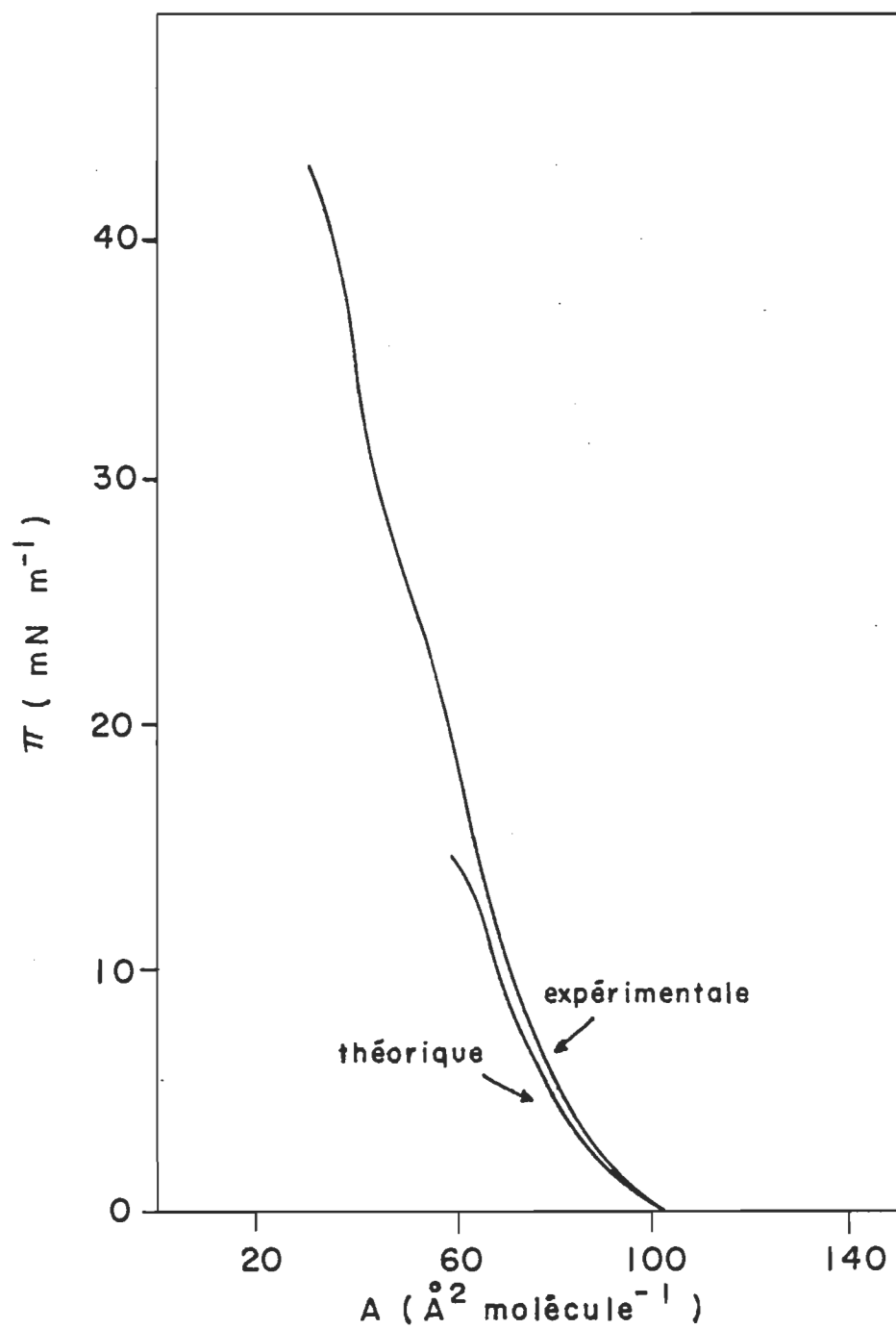


Figure 45. Isothermes de pression de surface: 0.5 11-cis/0.5 PE

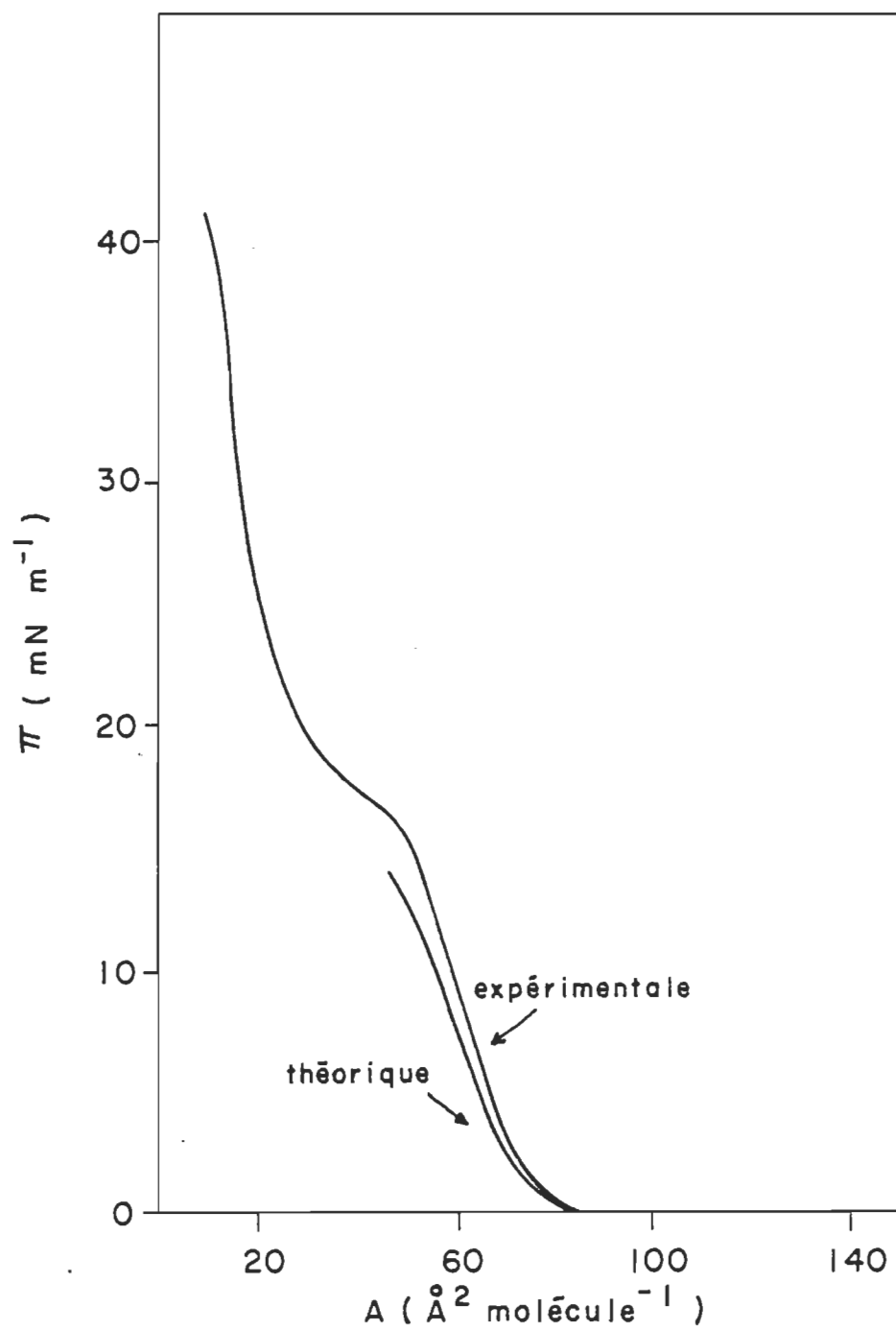


Figure 46. Isothermes de pression de surface: 0.8 11-cis/0.2 PE.

En comparant cette valeur à celle obtenue de l'isotherme de la PE pure (voir figure 44), $A_{44} = 59 \text{ Å}^2$, la différence est peu importante ce qui indique que le 11-cis rétinol est expulsé de la monocouche à des pressions de surface supérieures à 15 mN m^{-1} .

Quant aux autres mélanges, voici les résultats de ce calcul,

PE		Ramener à		PE pure
0.2 —————> 0.5 —————> 0.8 —————> 1.0				
A_{44}		51.5	64.4	$59 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$
A_{42}	33.0		66.0	$60 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$
A_{40}	$12.0 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$		60.0	$61 \text{ Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$

3.8.2 11-Cis rétinol/phosphatidylsérine

La figure 47 donne les isothermes de pression de surface des composés purs, soit le 11-cis rétinol (11-cis) et la phosphatidylsérine (PS).

Quant aux isothermes des mélanges 11-cis:PS, 0.2:0.8, 0.5:0.5, 0.8:0.2, on les trouve respectivement aux figures 48, 49 et 50.

Dans l'ensemble des résultats expérimentaux, ils sont comparables à ceux des mélanges 11-cis rétinol/phosphatidyléthanolamine. Par conséquent l'interprétation des données expérimentales est similaire à celle présentée à la section précédente. Dans ce qui suit, nous résumons ladite interprétation.

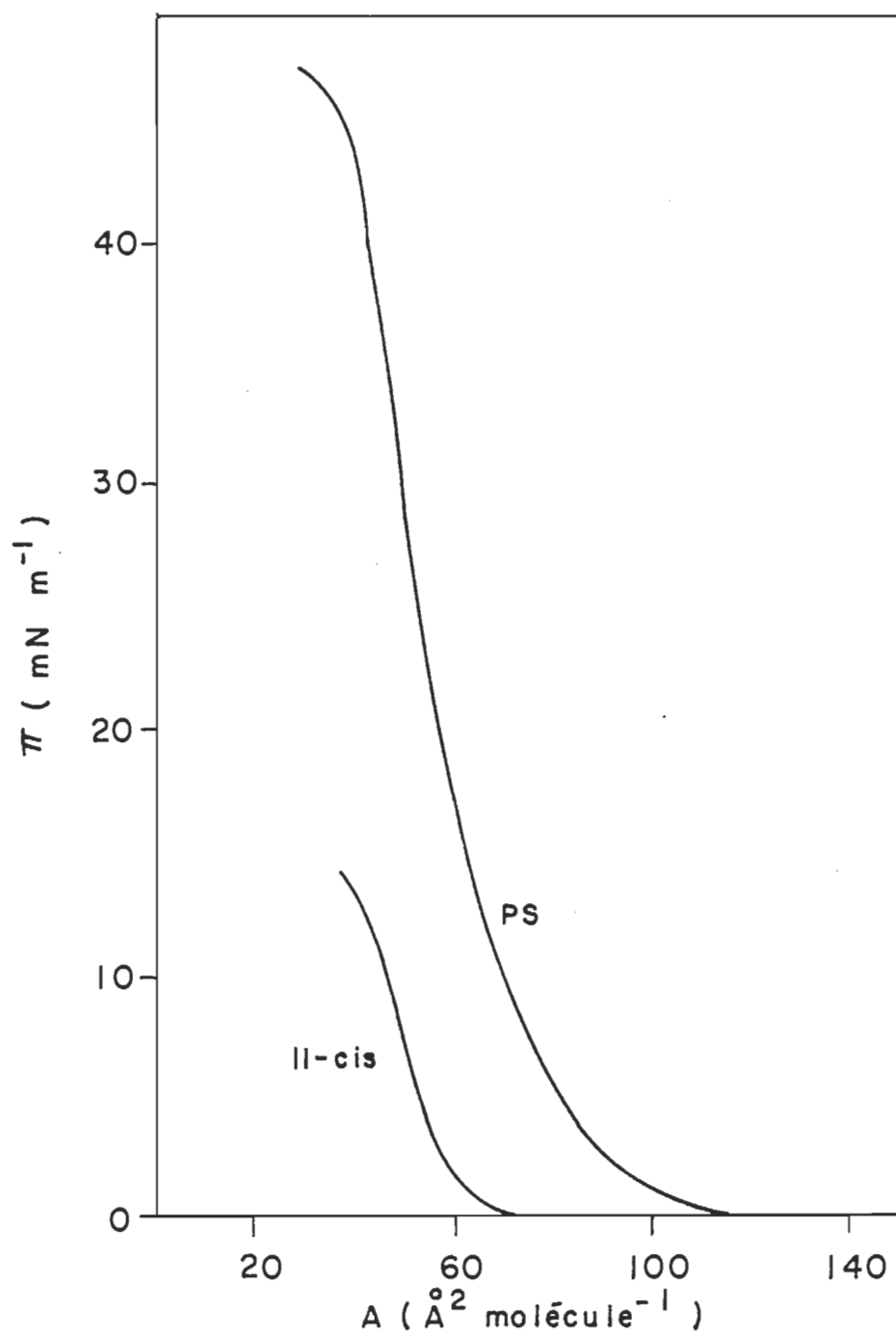


Figure 47. Isothermes de pression de surface du 11-cis rétinol (11-cis) et de la phosphatidylsérine (PS).

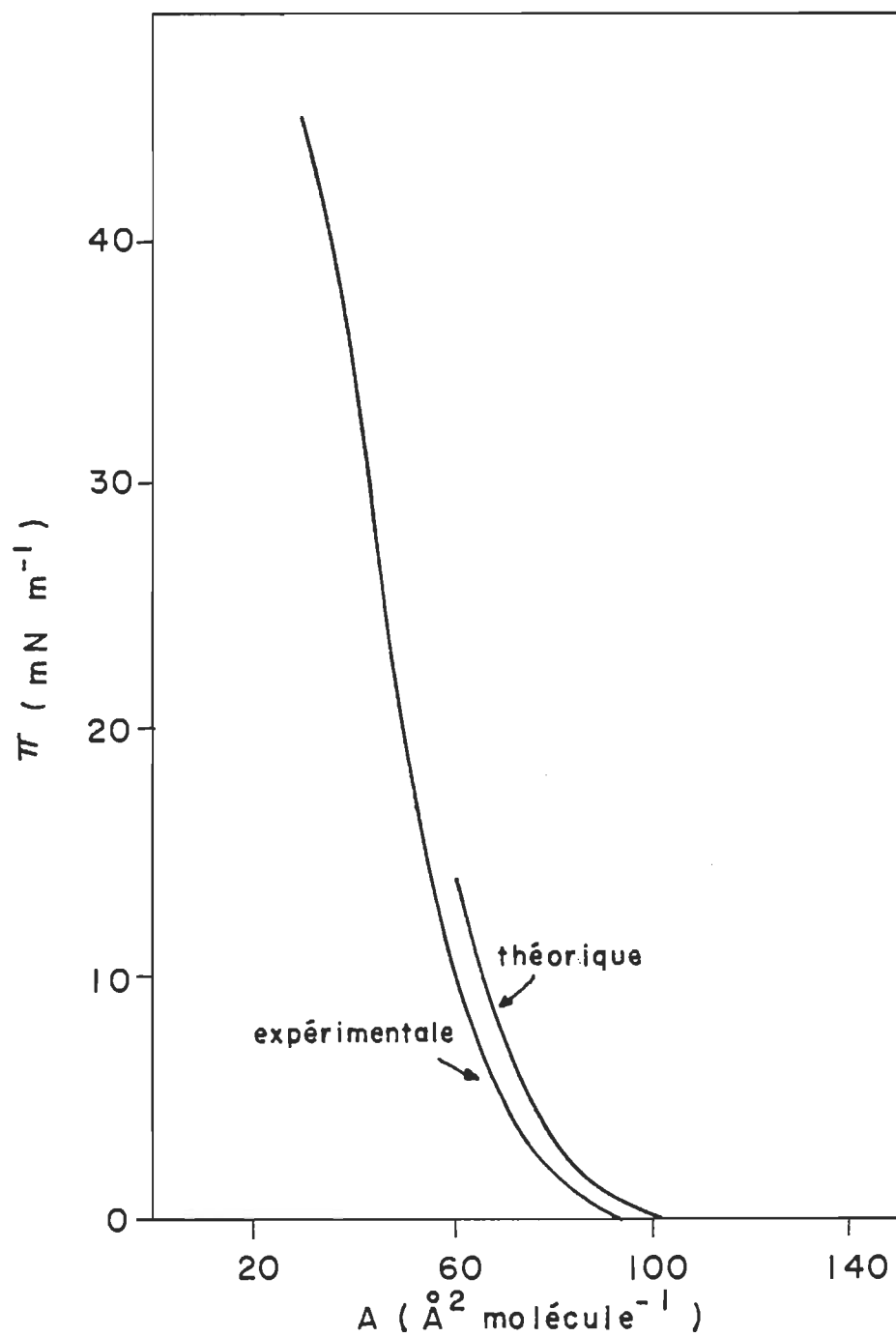


Figure 48. Isothermes de pression de surface: 0.2 11-cis/0.8 PS.

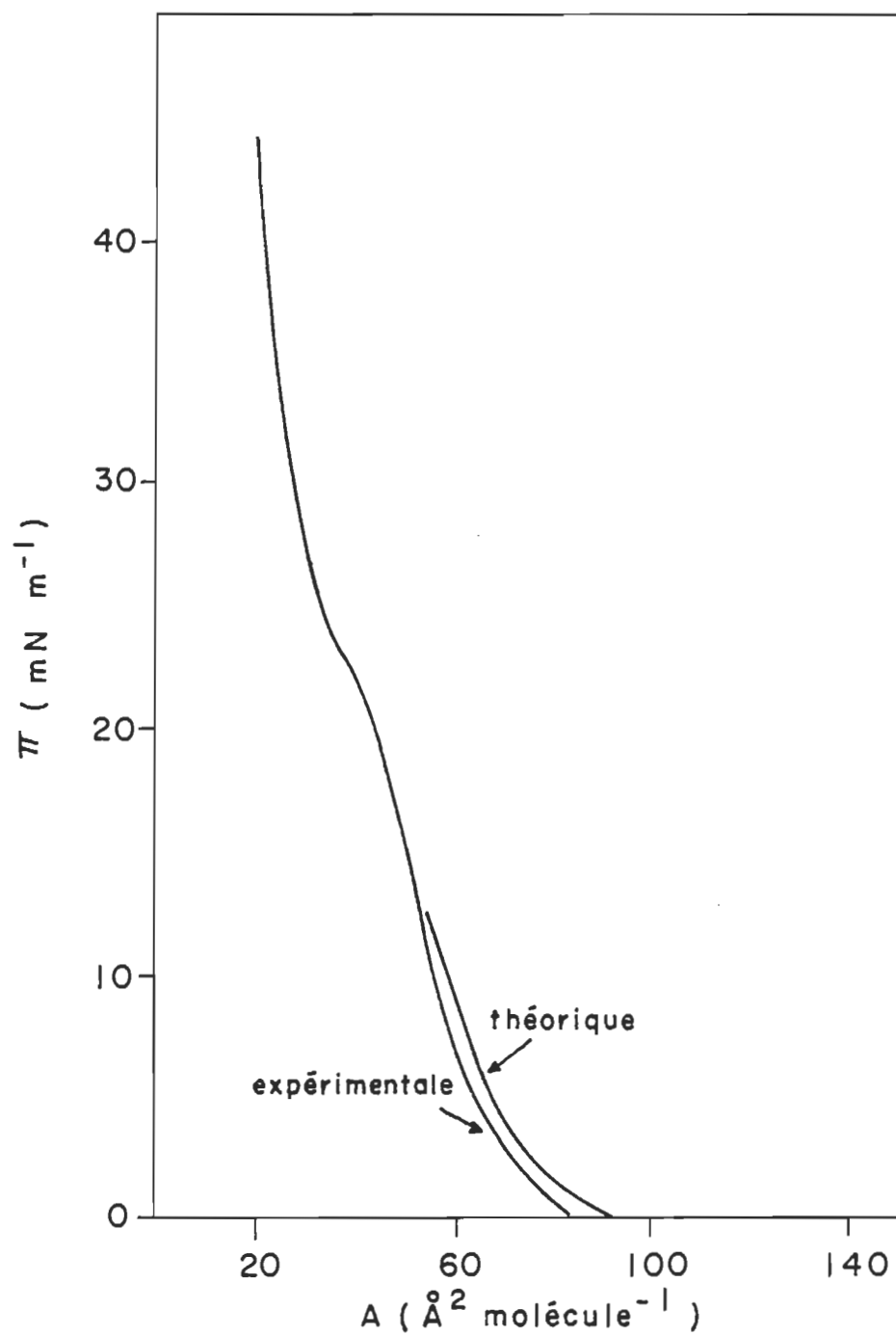


Figure 49. Isothermes de pression de surface: 0.5 11-cis/0.5 PS

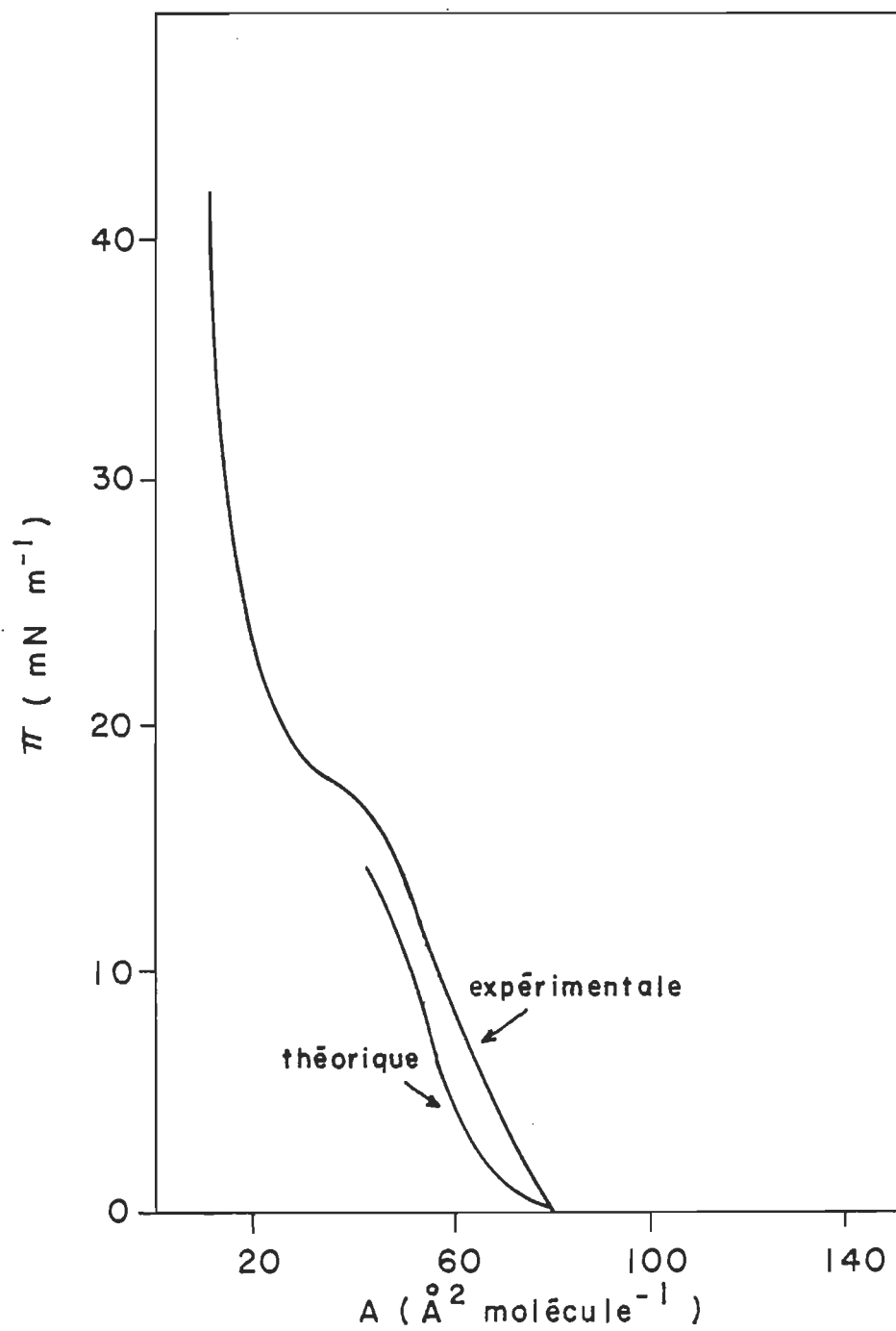


Figure 50. Isothermes de pression de surface: 0.8 11-cis/0.2 PS.

Dans le cas des mélanges, en considérant qu'il existe une différence entre les isothermes théoriques et expérimentales et que la pression de la région du collapse varie avec la fraction molaire de 11-cis, nous pouvons conclure que le polyène se dissout dans le phospholipide. Il ne fait aucun doute qu'il existe une interaction entre les deux constituants. Cette interprétation ne vaut que pour l'intervalle de pression de surface de 0 à 14 mN m⁻¹. A une pression supérieure, le 11-cis rétinale est éjecté de la monocouche tel que démontré en calculant l'aire moléculaire à 44 mN m⁻¹, A₄₄, calcul basé sur l'hypothèse que le 11-cis rétinale est éjecté. Le fait d'obtenir une valeur calculée près de la valeur expérimentale pour le PS pure prouve que l'hypothèse est raisonnable.

3.8.3 11-Cis rétinale/phosphatidylcholine

Les isothermes du 11-cis rétinale et de la phosphatidylcholine (PC) sont présentées à la figure 51. Les mélanges de 11-cis:PC, 0.2:0.8, 0.5:0.5, 0.8:0.2 ont été étudiés. Leurs isothermes calculées et expérimentales sont données respectivement aux figures 52, 53 et 54.

En examinant les résultats expérimentaux des mélanges de 11-cis rétinale:PC, nous arrivons à des conclusions différentes de ceux des mélanges de 11-cis rétinale:PE et de 11-cis:PS. Nous désirons préciser

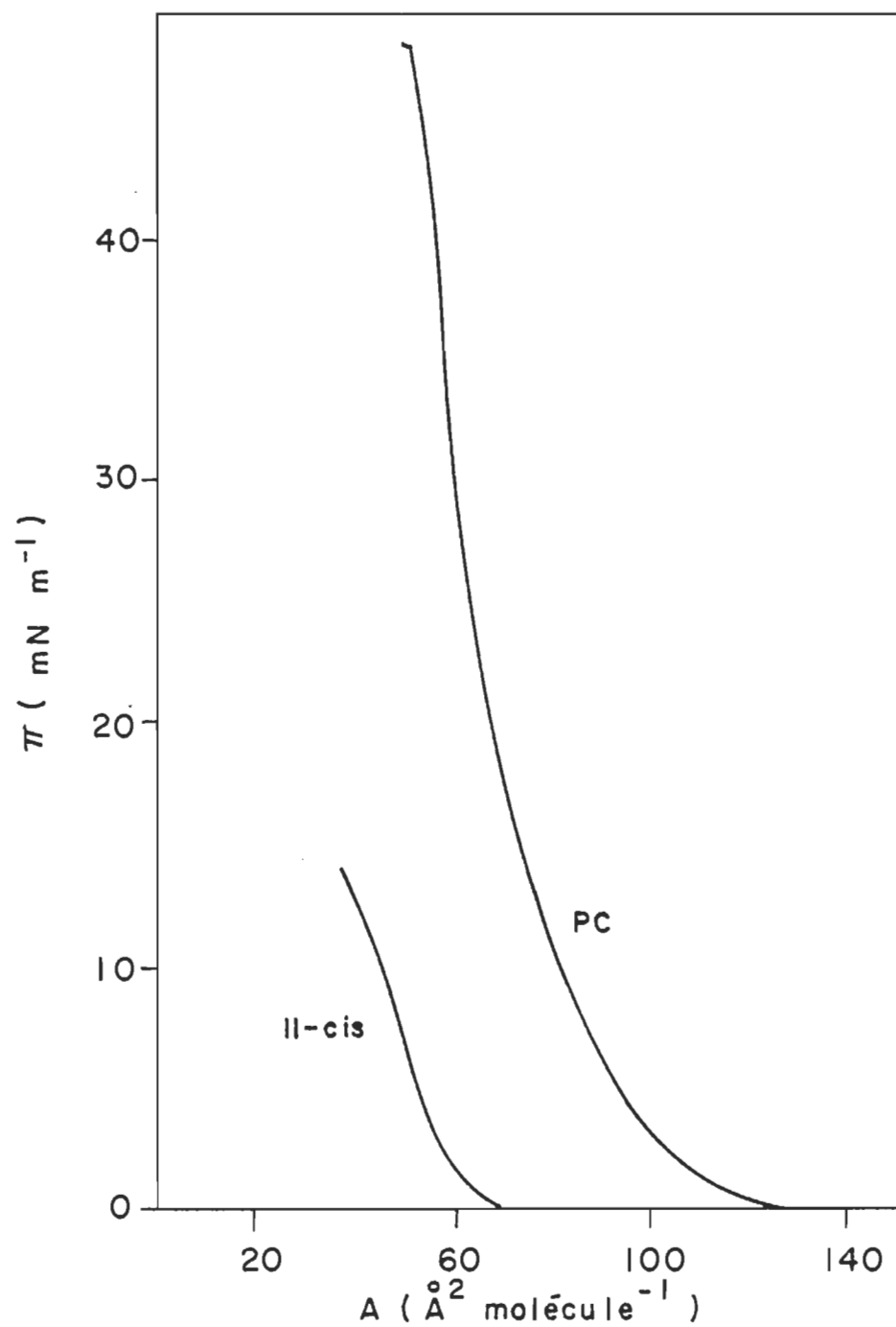


Figure 51. Isothermes de pression de surface du 11-cis rétinol (11-cis) et de la phosphatidylcholine (PC).

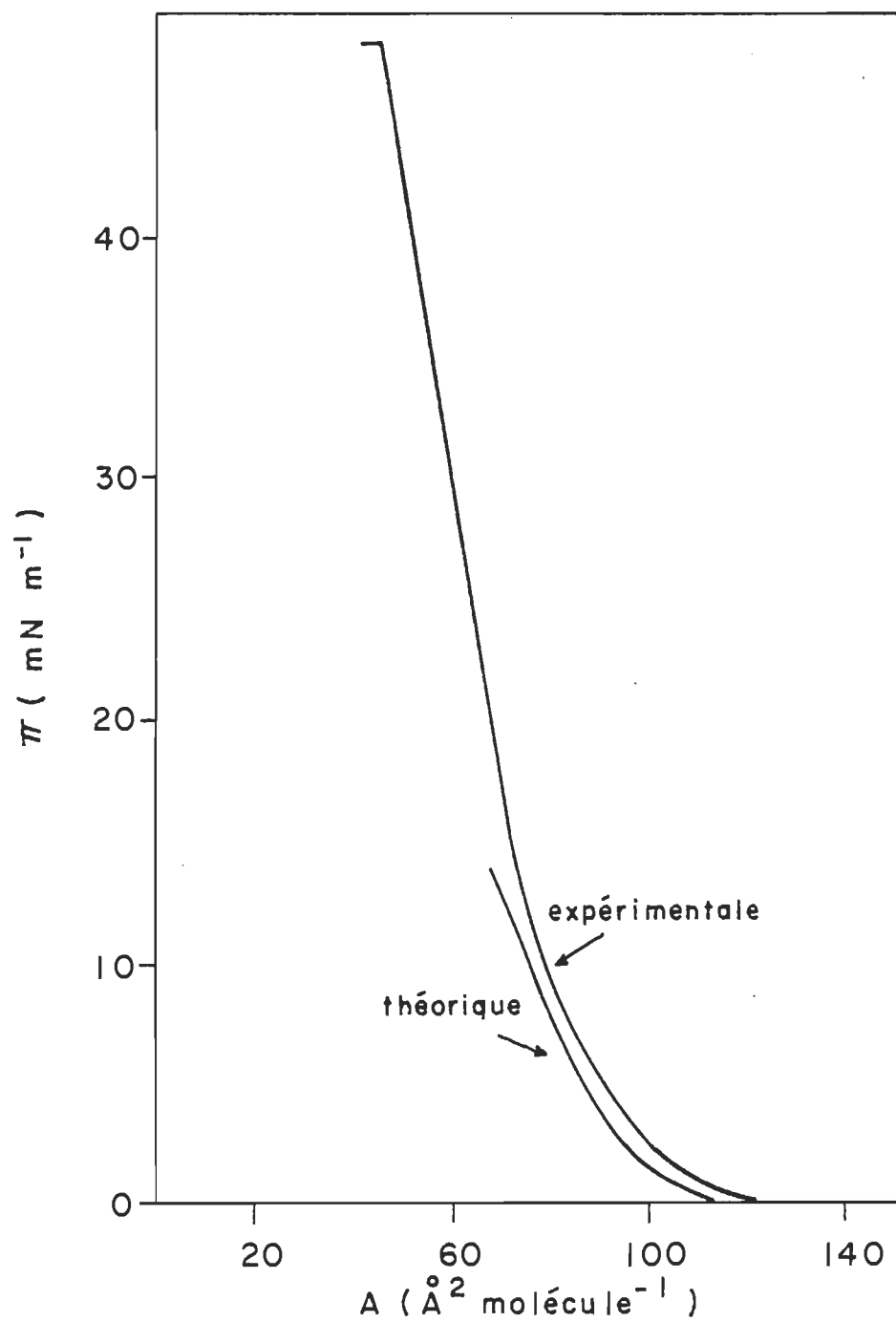


Figure 52. Isothermes de pression de surface: 0.2 11-cis/0.8 PC

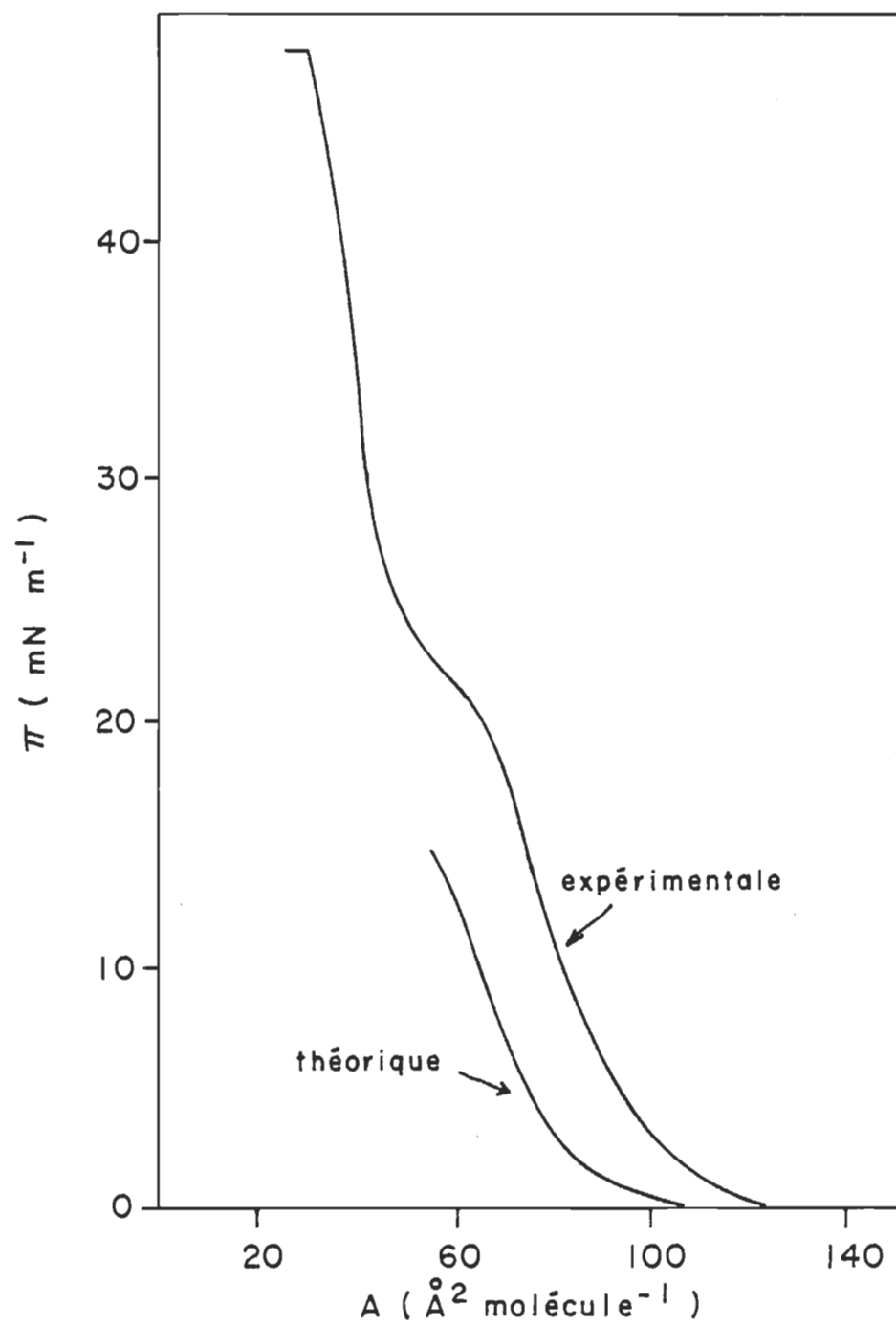


Figure 53. Isothermes de pression de surface: 0.5 11-cis/0.5 PC

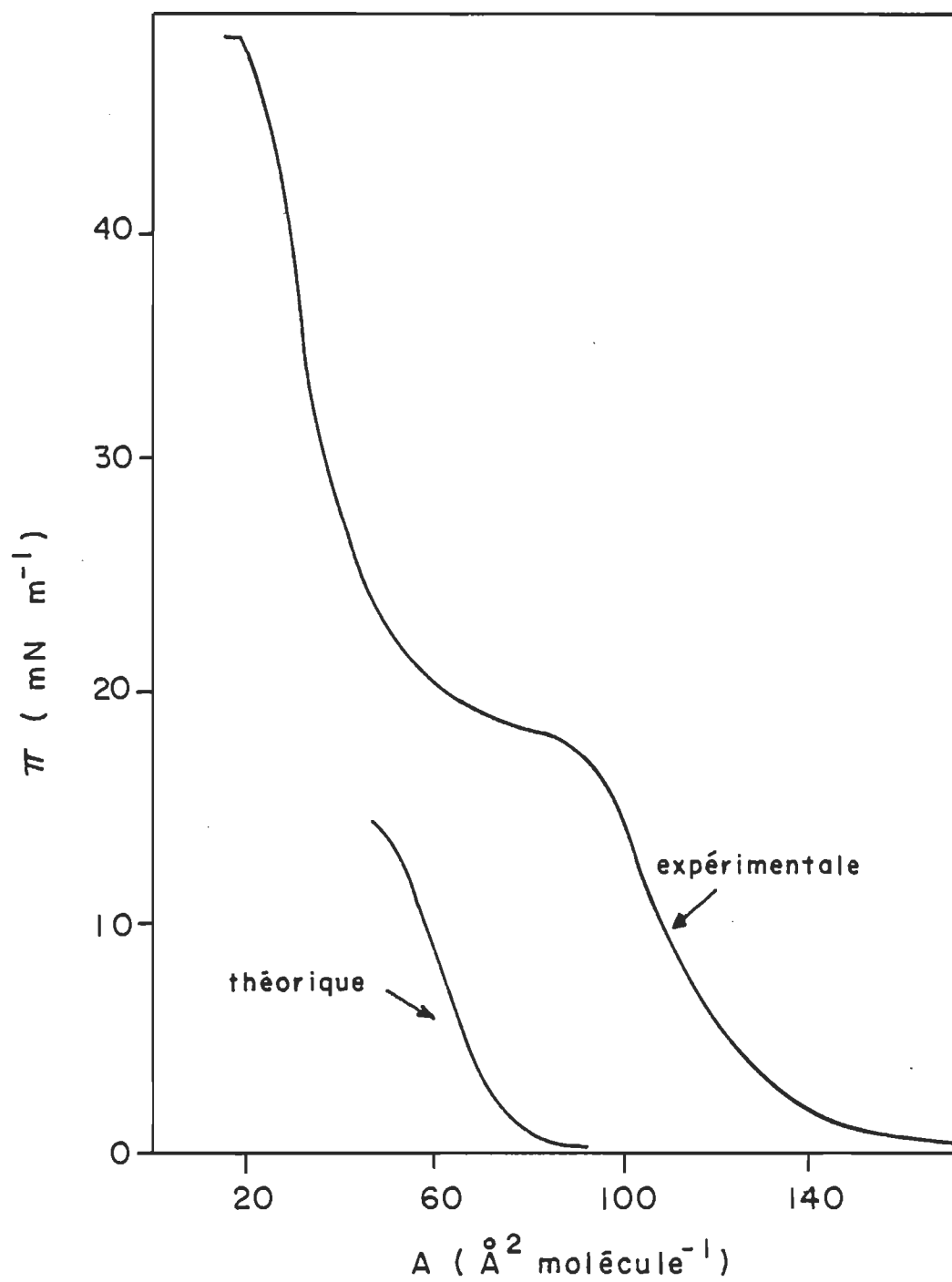


Figure 54. Isothermes de pression de surface: 0.8 11-cis/0.2 PC

que dans le cas des mélanges 0.5:0.5 et 0.8:0.2, nous observons une différence importante entre la courbe théorique et la courbe expérimentale. Cette différence est beaucoup plus grande dans le cas du système 11-cis:PC comparé à celui de 11-cis:PE ou 11-cis:PS. Quant à la région du collapse, elle est beaucoup plus prononcée dans les mélanges 11-cis:PC que les deux autres phospholipides (PE ou PS). De plus, la pression au collapse n'est pratiquement pas modifiée lors de l'augmentation de la fraction molaire en 11-cis rétinale ce qui pourrait indiquer que le 11-cis rétinale n'est pas miscible dans la phosphatidylcholine. Quant à l'expulsion du 11-cis rétinale à des pressions de surface supérieures à 15 mN m^{-1} que l'on a noté dans les mélanges 11-cis:PE et 11-cis:PS, on ne trouve pas le même phénomène dans les mélanges 11-cis:PC tel que montré dans le calcul qui suit. Ce résultat serait une preuve supplémentaire qu'il y a peu de miscibilité du 11-cis dans la phosphatidylcholine.

	PC		Ramener à		PC pure
	0.2	→ 0.5	→ 0.8	→ 1.0	
A_{46}			46	57.5	$52 \text{ A}^{\text{O}_2} \text{ molécule}^{-1}$
A_{46}		32		64	$52 \text{ A}^{\text{O}_2} \text{ molécule}^{-1}$
A_{46}	$24 \text{ A}^{\text{O}_2} \text{ molécule}^{-1}$			120	$52 \text{ A}^{\text{O}_2} \text{ molécule}^{-1}$

3.8.4 Travail futur

Il serait fort intéressant de comparer l'énergie libre de Gibbs, ΔG , pour les différents systèmes 11-cis rétinol/phospholipides. Cependant, il serait nécessaire de déterminer les isothermes de pression de surface pour un plus grand nombre de mélanges. Un calcul préliminaire de ΔG montre qu'il serait approprié d'étudier environ dix mélanges sur toute l'échelle de fraction molaire afin de pouvoir comparer correctement les courbes d'énergie libre en fonction de la fraction molaire de chaque système 11-cis rétinol/phospholipide.

Dans le cadre du présent mémoire, nous croyons que ces mesures dépassent l'objectif de notre projet de recherche. Toutefois, il ne fait pas de doute que ce travail devrait être poursuivi car l'étude des systèmes 11-cis rétinol/phospholipides est de première importance pour connaître l'interaction chromophore/phospholipide dans le photorécepteur visuel.

4. CONCLUSION

Dans le présent travail, nous avons déterminé à partir d'études en chromatographie sur couche mince ainsi que par spectroscopie en solution et en film solide que les molécules de polyènes conjuguées sont très sensibles à la température, à l'effet de la lumière et à l'autooxydation.

En déterminant les paramètres physico-chimiques des molécules comme le 11-cis rétinol et ses isomères, il a été possible d'en tirer des caractéristiques bien précises. Ainsi, la dégradation produite par effet de température, lumière et oxydation est beaucoup plus rapide chez les rétinols que les rétinals. De plus, les mesures en spectroscopie de fluorescence des films de rétinols ont permis de démontrer que tous les pigments (rétinals et rétinols) ont un déplacement vers le rouge comparés à leurs spectres en solution. Ce déplacement est expliqué par une interaction chromophore-chromophore à l'interface air/solide. Quant à la présence de la bande à 290 nm, on l'attribue à un produit d'oxydation du film de polyène. Les mesures de polarisation de fluorescence des rétinals et des rétinols montrent que l'excitation se produit dans la bande ${}^1\text{Bu} \leftarrow {}^1\text{Ag}$ de forte probabilité, cependant il faut tenir compte qu'il y a la possibilité d'un couplage des états excités.

Nous avons dirigé une partie de notre travail vers l'étude en monocouche de ces pigments afin de comparer les résultats spectroscopiques à ceux des films solides.

Nous avons aussi déterminé les paramètres qui nous permettent de prévoir le comportement des pigments à l'interface air/eau et de procéder à une étude plus poussée sur le rôle des pigments dans la membrane discale des bâtonnets. L'examen des mélanges de 11-cis rétinol et de différents phospholipides a apporté l'observation de résultats expérimentaux intéressants. En effet, le 11-cis rétinol est le chromophore de la rhodopsine, protéine responsable de l'absorption de l'énergie lumineuse. Cette protéine baigne dans une matrice lipidique. Lorsque l'on étudie les mélanges 11-cis rétinol/PE ou PS à pH = 7.2, on observe une miscibilité des constituants dans l'intervalle de pression de surface de 0 à 14 mN m⁻¹.

Quant aux mélanges 11-cis/PC, on note un comportement différent à celui des deux autres phospholipides quant aux propriétés monomoléculaires. On observe dans le cas de ces mélanges une répulsion des molécules, c'est-à-dire expansion du film. En considérant que la PE et PS sont distribuées majoritairement sur la face externe de la membrane discale tandis que la PC est concentrée sur la face interne, il est intéressant d'examiner l'emplacement du 11-cis rétinol en regard à la distribution des lipides. Ainsi, on aurait à pH = 7.2, une

membrane dont la face externe serait chargée négativement, on retrouverait alors le 11-cis rétinol lié à l'opsine dans une matrice lipidique de PE et PS. L'autre face de la membrane est constituée majoritairement de PC; dans ce cas, nos résultats démontrent qu'il y a une expansion de cette couche, puisque pour un mélange de 11-cis rétinol/PC, il existe un phénomène de répulsion entre les deux composés.

En considérant les mélanges 11-cis rétinol/phospholipides comme une introduction à un travail en profondeur, il serait important de reprendre cette étude avec des lipides synthétiques d'une plus grande pureté dont on connaîtrait la composition des chaînes d'acide gras. Une telle étude pourrait être suivie d'un projet relatif à l'effet de la lumière sur ces mélanges binaires afin de déterminer s'il y a spécificité d'un phospholipide sur l'interaction chromophore-lipide.

5. BIBLIOGRAPHIE

- Abrahamson, E.W. et S.M. Japar (1972). Principles of the interaction of light and matter. Handbook of sensory physiology VII/1. Photochemistry of vision. Editeur: J.A. Dartnall. pp. 1-32.
- Albrecht, A.C. (1961). Polarizations and assignments of transitions: the method of photoselection. J. Mol. Spectrosc. 6, 84-108.
- Anderson, P.A. et A.A. Evett (1952). Automatic recording of the pressure-area, pressure-time, and area-time characteristics of monomolecular films. Rev. sci. Instrum. 23, 485-488.
- Balke, D.E. et R.S. Becker (1967). Spectroscopy and photochemistry of all-trans retinal and 11-cis retinal. J. Am. Chem. Soc. 89, 5061-5062.
- Becker, R.S., K. Inuzuka, J. King et D.E. Balke (1971). Comprehensive investigation of the spectroscopy and photochemistry of retinals. II. Theoretical and experimental considerations of emission and photochemistry. J. Am. Chem. Soc. 93, 43-50.
- Becker, R.S., G. Hug, P.K. Das, A.M. Schaffer, T. Takemura, N. Yamamoto et W. Waddell (1976). Visual pigments. VI. Comprehensive consideration of the spectroscopy and photochemistry of model visual pigments. J. Phys. Chem. 80, 2265-2273.
- Bensasson, R., E.J. Land et T.G. Truscott (1975). Nanosecond flash photolysis of rhodopsin. Nature 258, 768-770.
- Birge, R.R., K. Schulten et M. Karplus (1975). Possible influence of a low-lying covalent excited state on the absorption spectrum and photoisomerization of 11-cis retinal. Chem. Phys. Lett. 31, 451-454.

- Birge, R.R., M. V. Sullivan et B.E. Kohler (1976). The effect of temperature and solvent environment of the conformational stability of 11-cis retinal. J. Am. Chem. Soc. 98, 358-367.
- Birge, R.R., J.A. Bennett, R.M. Pierce et T.M. Thomas (1978). Two-photon spectroscopy of the visual chromophores. Evidence for a lowest excited 'Ag like $\pi\pi^*$ state in all-trans retinol (vitamin A). J. Am. Chem. Soc. 100, 1533-1539.
- Birks, J.B. et D.J. Dyson (1963). The relations between the fluorescence and absorption properties of organic molecules. Proc. R. Soc. London A275, 135-143.
- Birks, J.B. et D.J.S. Birch (1975). The fluorescence of diphenyl and retinol polyenes. Chem. Phys. Lett. 31, 608-610.
- Brockman, R.E. et S.S. Brody (1971). Photoreactions and complex formation of retinal monolayers at a water-air interface. Z. Naturforsch. Teil C. 26, 119-125.
- Brody, S.S. (1973). Reactions of retinals in a model membrane system. Z. Naturforsch. Teil C. 28, 157-164.
- Brown, P.H. et G. Wald (1956). The neo-b isomer of vitamin A and retinene. J. Biol. Chem. 222, 865-877.
- Busch, G.E., M.L. Applebury, A.A. Lamola et P.M. Rentzepis (1972). Formation and decay of prelumirhodopsin at room temperature. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 2802-2806.
- Callender, R.N., A. Doukas, R. Crouch et K. Nakanoski (1976). Molecular flow resonance Raman effect from retinal and rhodopsin. Biochemistry 15, 1621-1629.
- Cavanagh, H.E. et G. Wald (1969). Purification and partial characterization of bovine visual pigment protein. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 28, 344.

- Chabre, M. (1976). La rétine sous le feu des neutrons. La Recherche 7, 1076-1079.
- Christensen, R.L. et B.E. Kohler (1974). Excitation spectroscopy of retinal and related polyenes. Photochem. Photobiol. 19, 401-410.
- Daemen, F.J.M., W.J. De Grip et P.A.A. Jansen (1972). Biochemical aspects of the visual process. XX. Molecular weight of rhodopsin. Biochim. Biophys. Acta 271, 419-428.
- Dalle, J.P. et B. Rosenberg (1970). Radiative and non-radiative losses in the retinol polyenes. Photochem. Photobiol. 12, 151-167.
- Dartnall, H.J.A. (1972). Handbook of sensory physiology. Photochemistry of vision VII/1. Springer-Verlag. Berlin.
- Dawson, W.R. et E.W. Abrahamson (1962). Population and decay of the lowest triplet state of polyenes with conjugated heteroatoms: Retinene. J. Phys. Chem. 66, 2542-2547.
- De Grip, W.J., S.L. Bonting et F.J.M. Daemen (1973). The binding site of retinaldehyde in matrice rhodopsine. Biochemistry and physiology of visual pigments. Editeur: H. Langer. Springer-Verlag. Berlin.
- Diertele, V.M. et C.D. Robertson (1954). Crystalline neoretinene-b. Science 120, 219-226.
- Ebrey, T.G. et B. Honig (1975). Molecular aspects of photo-receptor function. Q. Rev. Biophys. 8, 129-184.
- Finkel'stein, E.I., S.M. Dolotov et E.I. Kozlov (1978). Study of the mechanism of oxydation of retinyl polyenes with molecular oxygen. Possible role of reversibility of the reaction $R^1 - O_2 = RO_2$. Zh. Org. Khim. 14, 525-534.

- Futterman, A. et S. Futterman (1974). The stability of 11-cis retinal and reactivity towards nucleophiles. *Biochim. Biophys. Acta* 337, 390-394.
- Futterman, S. et A. Futterman (1973). The catalytic isomerization of all-trans retinal to 9-cis retinal and 13-cis retinal. *J. Biol. Chem.* 248, 7773-7779.
- Gaines, G.L. Jr. (1963). The design and operation of an automatic recording film balance. General Electric Research Laboratory. Report # 63. RL-3206C. pp. 1-15.
- Gaines, G.L. Jr. (1966). Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces. Wiley-Interscience, New York, N.Y. pp. 1-386.
- Goldschmidt, C.R., M. Ottolenghi et T. Rosenfeld (1976). Primary process in photochemistry of rhodopsin at room temperature. *Nature* 263, 169-171.
- Grellman, K.H., R. Livingston et D. Pratt (1962). A flash photolytic investigation of rhodopsin at low temperatures. *Nature* 193, 1258-1259.
- Guastalla, J. (1938). Une nouvelle technique pour la mesure des pressions superficielles très faibles. *C.R. Acad. Sci.* 206, 993-995.
- Hagins, W.A. (1972). The visual process: Excitatory mechanisms in the primary receptor cells. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 1, 131-158.
- Hagins, W.A. et S. Yoshikani (1975). Ionic mechanisms in excitation of photoreceptors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 264, 314-325.
- Ham, A.W. (1969). *Histology. The eye.* 6ième édition. J.B. Lippincott Company. Philadelphia. pp. 973-1000.

- Hausser, K.W., R. Kuhn, A. Sinakula et K.H. Kreuchen (1935). Absorption of light and double bonds. I. Problems and methods. *Z. Physik. Chem.* R29, 363.
- Hochstrasser, R.M. (1968). Analytical and structural aspects of vibrance interactions in the Ultraviolet spectra of organic molecules. *Accounts of Chemical Research.* 1, 266-274.
- Honig, B. et T.G. Ebrey (1974). The structure and spectra of the chromophore of the visual pigments. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 3, 151-177.
- Honig, B., A. Warshell et M. Karplus (1975). Theoretical studies of the visual chromophore. *Acc. Chem. Res.* 8, 92-100.
- Hotchandani, S., R.M. Leblanc et F. Boucher (1975). Monolayer studies of retinyl polyenes I. Spectroscopic properties. *Vision Res.* 15, 605-611.
- Hotchandani, S. et R.M. Leblanc (1976). Spectroscopic behaviour of retinyl polyenes in solid films. *Photochem. Photobiol.* 24, 59-65.
- Hotchandani, S., P. Paquin et R.M. Leblanc (1977). Spectroscopic behaviour of 11-cis retinal in solid film. *Photochem. Photobiol.* 26, 167-168.
- Hotchandani, S., P. Paquin et R.M. Leblanc (1978). Fluorescence studies of retinol and retinyl acetate. *J. Lumin.* 20, 59-65.
- Hotchandani, S., P. Paquin et R.M. Leblanc (1978). Polarized fluorescence study of retinals at room temperature. *Can. J. Chem.* 56, 1985-1988.
- Hubbard, R. et G. Wald (1968). Pauling and carotenoid stereochemistry. *Structural chemistry and molecular biology*. Editeurs: A. Rich et N. Davidson. Freeman. San Francisco.
- Hudson, B.S. et B.E. Kohler (1972). A low-lying weak transition in the polyene α,ω -diphenyloctatetraene. *Chem. Phys. Lett.* 14, 299-304.

- Hudson, B.S. et B.E. Kohler (1973). Comment on the "Polarized fluorescent spectra of retinol and diphenyloctatetraene". Chem. Phys. Lett. 23, 139.
- Hudson, B.S. et B.E. Kohler (1974). Linear polyene electronic structure and spectroscopy. Annu. Rev. Phys. Chem. 25, 437-460.
- Hug, G. et R.S. Becker (1976). Solvent and temperature effects on natural radiative lifetimes of some substituted polyenes. J. Chem. Phys. 65, 55-63.
- Ippen, E.P., C.V. Shank, A. Lewis et M.A. Marcus (1978). Subpicosecond spectroscopy of bacteriorhodopsin. Science 200, 1279-1281.
- John, K.J., M.R. Lakshmanan, F.B. Jungalwala et H.R. Cama (1965). Separation of vitamin A, and A₂ and allied compounds by thin-layer chromatography. J. Chromatogr. 18, 53-56.
- Junk, R. (1973). Handbook of sensory physiology. Part A. Central processing of visual information. Part B. Visual Centers in the brain VII/3. Springer-Verlag. Berlin.
- Karan, H.I. et S.S. Brody (1975). Studies on fragments of rod outer segments from bovine retinas. Z. Naturforsch. Teil C. 30, 796-799.
- Karplus, M., R.M. Gavin et S.A. Rice (1975). Reinterpretation of hexatriene spectrum and comparison with theory. J. Chem. Phys. 63, 5507-5508.
- Kossi, C., G. Munger et R.M. Leblanc (1977). Molecular weight of bovine rhodopsin as determined by the monolayer method. Vision Res. 17, 917-918.
- Langmuir, I. (1917). Contribution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. J. Am. Chem. Soc. 39, 1848-1906.

- Lewis, M.S., L.C. Krieg et W.D. Kirk (1974). Molecular weight and detergent binding of bovine rhodopsin. *Exp. Eye Res.* 18, 29-40.
- Mann, J.A. et R.S. Hansen (1960). A simple technique for the automatic recording of monolayer compression characteristics. *Rev. Sci. Instrum.* 31, 961-963.
- Mathies, R., A.R. Oseroff et L. Stryer (1976). Rapid flow resonance Raman spectroscopy of photolabile molecules. Rhodopsin and isorhodopsin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 1-5.
- McRae, E.G. et M. Kasha (1964). The molecular exciton model. In *Physical processes in radiation biology*. Editeurs: Augustein, L.G., B. Rosenberg et R. Mason. Academic Press. New York. pp. 23-42.
- Moore, T.A. et P.S. Song (1973). Molecular interactions in the ground and excited states of retinal. *Nature, New Biol.* 243, 30.
- Moore, T.A. et P.S. Song (1973). Polarized fluorescence spectra of retinol and diphenyloctatetraene. *Chem. Phys. Lett.* 19, 128-130.
- Munger, G. (1978). Détermination du poids moléculaire de protéine à l'interface air/eau par un nouveau système à faible pression de surface. Thèse de maîtrise en Sciences de l'environnement. Université du Québec à Trois-Rivières. Québec.
- Munger, G. et R.M. Leblanc (1980). New method of studying the low surface pressures of monolayer at air/water interface. *Rev. Sci. Instrum.* 51, 710-714.
- Paquin, P., S. Hotchandani et R.M. Leblanc (1977). Spectroscopie électronique du 11-cis rétinol en film solide. 45ième Congrès de l'ACFAS. *Annales de l'ACFAS* 44, 25.

- Pirenne, M.H. et R. Crouzy (1972). L'oeil et la vision. Gauthier-Villars, Paris, pp. 1-267.
- Platt, J.R. (1953). Classification and assignments of ultraviolet spectra and conjugated organic molecules. J. Opt. Soc. Am. 43, 253-257.
- Platt, J.R. (1956). Electronic structure and excitation of polyenes and porphyrins. Radiation Biology. Editeur: A. Hollaenden. McGraw-Hill. New York. Chapitre 2.
- Puppala, N. et S.S. Brody (1975). Interaction between retinol and phospholipids in monomolecular films at acid pH. Z. Naturforsch. Teil C. 30, 478-483.
- Schaffer, A.M., W.H. Waddell et R.S. Becker (1974). Visual pigments. IV. Experimental and theoretical investigations of the absorption spectra of retinal Schiff base and retinals. J. Am. Chem. Soc. 96, 2063-2068.
- Schulten, K. et M. Karplus (1972). On the origin of a low lying forbidden transition in polyenes and related molecules. Chem. Phys. Lett. 14, 305-309.
- Schulten, K., I. Ohmine et M. Karplus (1976). Correlation effects in the spectra of polyenes. J. Chem. Phys. 64, 4422-4441.
- Shichi, H. (1976). Molecular biology of the visual process. Basic Neurochemistry. Editeurs: Siegel, Abbers, Katzman, Agranoff. 2ième édition. Little Brown and Company, U.S.A. pp. 148-163.
- Sperling, W. (1973). Conformation of 11-cis retinal. Biochemistry and physiology of visual pigments. Editeur: H. Langer. Springer-Verlag. Berlin. pp. 19-28.
- Staff of the Biological Laboratories of Harvard University, Cambridge, Mass. (1959). Photochemical and stereochemical properties of carotenoids at low temperatures. Nature 184, 614-624.

Stahl, E. (1969). Thin-layer chromatography. 2ième édition. Springer-Verlag. Berlin.

Stone, W.L. et E.A. Dratz (1977). Yearly review. Visual photoreceptors. Photochem. Photobiol. 26, 79-85.

Sundstrom, V., P.M. Rentzepis, K. Peters et M.L. Applebury (1977). Kinetics of rhodopsin at room temperature measured by picosecond spectroscopy. Nature 267, 645-646.

Suzuki, A., S. Ikeda et I. Isemura (1967). Automatic recording systems for monolayers study. Annual Report of Biology Works. Osaka University. 15, 83-96.

Takemura, T., P.K. Das, G. Hug et R.S. Becker (1976). Emission spectroscopy and state ordering of retinals. J. Am. Chem. Soc. 98, 7099-7101.

Takemura, T., P.K. Das, G. Hug et R.S. Becker (1978a). Visual pigments. VIII. Hydrogen bonding effects on fluorescence properties of retinals. J. Am. Chem. Soc. 100, 2626-2630.

Takemura, T., G. Hug, P.K. Das et R.S. Becker (1978b). Visual pigments. IX. Fluorescence of dimers of retinals. J. Am. Chem. Soc. 100, 2631-2634.

Taylor, J.E. (1960). Apparatus for the continuous production of triple distilled water. J. Chem. Educ. 37, 204-205.

Thomson, A.J. (1969). Fluorescence spectra of some retinyl polyenes. J. Chem. Phys. 51, 4106-4116.

Tokunga, F., S. Kawamura et T. Yoshizawa (1976). Analysis by spectral difference of the oriented change of the rhodopsin chromophore during bleaching. Vision Res. 16, 633-641.

- Waddell, W.H., A.M. Schaffer et R.S. Becker (1973). Visual pigments. 3. Determination and interpretation of the fluorescence quantum yield of retinals, Schiff bases, and protonated Schiff bases. J. Am. Chem. Soc. 95, 8223-8227.
- Waddell, W., A.M. Schaffer et R.S. Becker (1977). Visual pigments. VII. Experimental and theoretical investigations of the absorption spectral properties of protonated retinal Schiff bases and implications for the bathochromic shift in visual pigments. J. Am. Chem. Soc. 99, 8456-8460.
- Wald, G. (1933). Vitamin A in the retina. Nature 132, 316-317.
- Warshel, A. et M. Karplus (1974). Calculation of $\pi\pi^*$ excited state conformations and vibronic structures of retinal and related molecules. J. Am. Chem. Soc. 96, 5677-5689.
- Yckowski, N. et S.S. Brody (1974). Interactions of monomolecular films of retinal at alkaline pH. Z. Naturforsch. Teil C. 29, 327-335.
- Yoshizawa, T. et Y. Kito (1958). Chemistry of rhodopsin cycle. Nature 182, 1604-1605.
- Yoshizawa, T. et G. Wald (1963). Prelumirhodopsin and the bleaching of the visual pigments. Nature 197, 1279-1286.